

UNTERSUCHUNG VON NITROFURANTOIN UND NIFURPAZIN
AUF RADIKALBILDENE EIGENSCHAFTEN IN VIVO

JOSEF LOSERTH

Süss
München
1985

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. A. Schmid

UNTERSUCHUNG VON NITROFURANTOIN UND NIFUR-PAZIN AUF
RADIKALBILDENDE EIGENSCHAFTEN IN VIVO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Josef Loserth
aus
Kösching

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. A. Schmid

Korreferent: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Tag der Promotion: 22. Februar 1985

Meiner Frau
und
meiner Mutter



Digitized by the Internet Archive
in 2026

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
<u>I Einleitung</u>	1
<u>II Literaturübersicht</u>	3
<u>1 Toxikologische Bedeutung chemischer Radikale</u>	3
<u>1.1 Definition und Eigenschaften</u>	3
<u>1.2 Entstehung von Radikalen in biologischen Systemen</u>	3
1.2.1 Unimolekulare Homolyse	3
1.2.2 Radikalbildung durch ionisierende Strahlung	4
1.2.3 Ein-Elektronen-Transfer von Übergangsmetallen	4
1.2.4 Radikalbildende Umweltgifte	5
1.2.5 Radikalbildung durch halogenierte Kohlenwasserstoffe	6
1.2.6 Enzymatische Radikalbildung	7
<u>1.3 Radikalreaktionen im Organismus</u>	9
<u>1.4 Biologische Radikalwirkung</u>	12
<u>1.5 Biologische Schutzmechanismen</u>	13
1.5.1 Sauerstoffpartialdruck	13
1.5.2 Membranstruktur	14
1.5.3 Antioxidantien	14
1.5.4 Enzymsysteme	15
<u>1.6 Nachweis von Radikalen und deren Reaktionsprodukten</u>	16
<u>2 Nitrofurane</u>	18
<u>2.1 Bedeutung und Verwendung</u>	18
<u>2.2 Physikalische und chemische Eigenschaften</u>	20
<u>2.3 Stoffwechselverhalten</u>	22
2.3.1 Resorption, Verteilung und Ausscheidung	22
2.3.2 Metabolisierung	24
<u>2.4 Wirkung auf Bakterien</u>	29
2.4.1 Antibakterielle Aktivität	29
2.4.2 Resistenzbildung	30
<u>2.5 Wirkung auf Protozoen, Algen, Pilze und Hefen</u>	31
<u>2.6 Nebenwirkungen</u>	31
2.6.1 Wirkung auf Organe und Gewebe	31
2.6.2 Teratogenität und Einfluß auf die Fruchtbarkeit	33
2.6.3 Mutagenität	33
2.6.4 Kanzerogenität	34

	Seite
III <u>Eigene Untersuchungen</u>	36
1 <u>Vorbemerkung</u>	36
2 <u>Versuchsplan</u>	38
3 <u>Versuchstiere</u>	38
4 <u>Untersuchungsmethode</u>	40
4.1 Chemikalien, Lösungen und Gase	40
4.2 Versuchsablauf	43
4.3 Kohlenwasserstoffnachweis	43
4.4 Malondialdehyd (MDA)-Nachweis	43
4.5 Glutathionbestimmung	44
4.6 Einstellung des Sauerstoffpartialdruckes	45
4.7 Induktion und Hemmung der NADPH-Cytochrom c-Reduktase	45
4.8 Induktion und Hemmung der Xanthinoxidase	45
4.9 Vorbehandlung mit Eisenionen	46
4.10 Senkung des Glutathionspiegels	46
4.11 Erhöhung des H_2O_2 -Spiegels	46
5 <u>Versuchsauswertung</u>	47
5.1 Kohlenwasserstoffberechnung	47
5.1.1 Qualitative Bestimmung	47
5.1.2 Quantitative Bestimmung	47
5.2 Malondialdehydberechnung	50
5.3 Glutathionbestimmung	52
5.4 Ergebnisbeurteilung	54
6 <u>Ergebnisse</u>	55
6.1 <u>Blindversuche ohne Versuchstiere</u>	55
6.1.1 Blindversuche mit synthetischer Luft	55
6.1.2 Blindversuche mit Referenzgasen	55
6.2 <u>Testversuche mit Nitrofurantoin</u>	56
6.2.1 Versuche mit verschiedenem Sauerstoffpartialdruck	56
6.2.2 Versuche mit Phenobarbital- oder Piperonyl- butoxidvorbehandlung	62
6.2.3 Versuche mit Xanthin- oder Allopurinolvorbehandlung	66
6.2.4 Versuche mit Eisenvorbehandlung	70

	Seite
6.2.5 Versuche mit DEM-Vorbehandlung	73
6.2.6 Versuche mit DEM- und Aminotriazol- vorbehandlung	77
6.3 <u>Testversuche mit Nifurprazin</u>	80
6.3.1 Versuche mit verschiedenem Sauerstoff- partialdruck	80
6.3.2 Versuche mit Phenobarbital oder Piperonylbutoxidvorbehandlung	85
6.3.3 Versuche mit Xanthin- oder Allopurinol- vorbehandlung	89
6.3.4 Versuche mit Eisenvorbehandlung	93
6.3.5 Versuche mit DEM-Vorbehandlung	97
6.3.6 Versuche mit DEM- und Aminotriazol- vorbehandlung	100
6.4 <u>Vergleichende Zusammenfassung</u>	103
6.4.1 Einfluß des Sauerstoffpartialdruckes	103
6.4.2 Versuchstievorbehandlung mit Pheno- barbital und Piperonylbutoxid	104
6.4.3 Versuchstievorbehandlung mit Xanthin und Allopurinol	105
6.4.4 Versuchstievorbehandlung mit Eisen(II)- sulfat oder Eisen(III)-dextran	106
6.4.5 Versuchstievorbehandlung mit Diethyl- maleinat plus Aminotriazol	107
IV <u>Diskussion</u>	108
V <u>Zusammenfassung - Summary</u>	114
VI <u>Literaturverzeichnis</u>	117

I Einleitung

Die 5-Nitrofuranderivate repräsentieren eine Stoffgruppe, welche Verwendung findet bzw. gefunden hat als

- lokal und systemisch anwendbare Chemotherapeutika gegen pathogene Bakterien, Kleinpilze und Protozoen von Menschen und Tieren,
- Konservierungsstoffe für Lebensmittel pflanzlicher und tierischer Herkunft sowie
- Futter-Zusatzstoffe für schlachtbare Nutztiere etc. (Bryan 1978).

Im Laufe der Zeit hat sich jedoch gezeigt, daß viele Nitrofuranderivate mutagene und/oder kanzerogene Eigenschaften haben. Ihre Mutagenität ist von Szybalski (1958), ihre Kanzerogenität von Stein et al. (1966) erstmals beschrieben worden.

Für beide Eigenschaften ist die allen Nitrofuranen gemeinsame Nitrogruppe in 5-Stellung essentiell (Klemencic und Wang 1978). Es bestehen jedoch quantitative Unterschiede zwischen den einzelnen Derivaten, welche offenbar von der unterschiedlichen Beschaffenheit der Seitenkette in 2-Stellung abhängen.

Die Seitenkette bestimmt vor allem den Umfang der Nitrogruppenreduktion in vivo und damit die Entstehung von mutagenen und/oder kanzerogenen Metaboliten (Cohen 1978; Swaminathan und Lower 1978). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um reaktionsfreudige Intermediate wie Nitrofuranradikale oder Hydroxylamine etc., die zur kovalenten Bindung an Makromoleküle, z. B. Nukleinsäuren, befähigt sind und so die genetische Information von Keimzellen und/oder sonstigen Zellen verändern.

Zur Überprüfung dieser Hypothese sind

- Nitrofurantoin, ein auch in der Humanmedizin gebräuchliches Nitrofuranderivat zur Behandlung von Harnwegs-

infektionen und

- Nifurprazin, das zur Behandlung von Wunden und Verbrennungen Verwendung gefunden hat, auf radikalbildende Eigenschaften in vivo untersucht worden.

Bei der Auswahl dieser Nitrofurane ist einerseits ihre praktische Bedeutung und andererseits der Umstand berücksichtigt worden, daß Nitrofurantoin ein Azomethin-derivat o h n e kanzerogene Eigenschaften und Nifurprazin ein Vinylderivat m i t kanzerogenen Eigenschaften ist (Anonym 1976; Klemencic und Wang 1978).

II Literaturübersicht

1 Toxikologische Bedeutung chemischer Radikale

1.1 Definition und Eigenschaften

Unter chemischen Radikalen ($R^\bullet$) versteht man Atome oder Moleküle mit einem ungepaarten Valenzelektron (Demopoulos 1973a); sie können positiv geladen, negativ geladen oder elektrisch neutral sein.

In biologischen Systemen liegt die Konzentration freier chemischer Radikale in der Größenordnung von 10^{-4} bis 10^{-9} mol/l (Pryor 1976). Wichtigste Ursache dieser relativ niedrigen Konzentration ist die hohe Reaktionsfähigkeit der Radikale, d. h. der rasche Eintritt von Radikalreaktionen. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist dabei vor allem von der Konzentration der Reaktionspartner und der Temperatur des Mediums abhängig, in welchem die Radikale vorliegen (Pryor 1976).

1.2 Entstehung von Radikalen in biologischen Systemen

1.2.1 Unimolekulare Homolyse

Die Bildung von Radikalen (Initiation) kann durch thermische Homolyse einer Atombindung erfolgen (Pryor 1973; Pryor 1976). Der Vorgang läßt sich durch die Reaktion



beschreiben. Die thermische Homolyse ist bei Körpertemperatur auf Grund der notwendigen hohen Aktivierungsenergie sehr selten und damit als Quelle für die Bildung von freien Radikalen von untergeordneter Bedeutung (Pryor 1973).

Eine chemische Induktion durch andere Moleküle kann

die notwendige Aktivierungsenergie für die homolytische Spaltung einer Atombindung herabsetzen. Zum Beispiel wird die Aufspaltung von Chlormolekülen durch die Anlagerung an Ölefine wesentlich erleichtert (Pryor 1973; Pryor 1976).

1.2.2 Radikalbildung durch ionisierende Strahlung

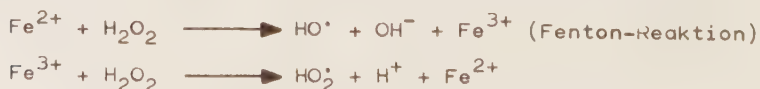
Eine weitere Bildungsmöglichkeit von Radikalen ist die Einwirkung von ionisierenden Strahlen (UV-Licht, Röntgen- und Gamma- sowie Teilchenstrahlung) auf wasserhaltige Medien. Dabei werden energetisch angeregte Wassermoleküle (H_2O^*) und Kationenradikale ($\text{H}_2\text{O}^{\bullet+}$) gebildet, die beim Zerfall oder einer Reaktion mit Wassermolekülen u. a. zu atomarem Wasserstoff ($\text{H}^\bullet$), Hydroxylradikalen ($\text{HO}^\bullet$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) weiterreagieren (Lissner und Hug 1975; Pryor 1973; Tempel 1983).

Soweit es sich um UV-Licht handelt, ist die Wirkung der so entstehenden Radikale auf die Körperoberfläche höherer Lebewesen und auf durchsichtige Mikroorganismen beschränkt (Pryor 1976); die entsprechende Wirkung der übrigen ionisierenden Umweltstrahlung ist von untergeordneter Bedeutung (Pryor 1976).

1.2.3 Ein-Elektronen-Transfer von Übergangsmetallen

Durch die Katalyse von Übergangsmetallionen können auf verschiedenem Wege Radikale entstehen. Nachfolgend ist eine Reihe von Beispielen angegeben:

a) Übergangsmetallionen (z. B. Eisenionen) produzieren zusammen mit Wasserstoffperoxid Hydroxylradikale und Hydroperoxidradikale (Pryor 1976):



Analog ist auch die Spaltung von Lipidhydroperoxiden möglich (Beuter 1981; Chan et al. 1982; Demopoulos 1973b; Friedrich 1981; Mead 1976; Pryor 1973; Pryor 1976).

b) Als zweite Möglichkeit der Radikalbildung durch die Katalyse von Übergangsmetallionen (Me^{n+}) soll an dieser Stelle die Initiation von Hydroperoxidradikalen genannt werden (Schmid und Christoph 1980; Schmid und Richter 1976; Smith und Dunkley 1962):



Hydroperoxidradikale können mit organischen Molekülen direkt weiterreagieren oder indirekt über die spontane Dismutation zu Singletsauerstoff (O_2^*) (Khan 1970):



c) Weiterhin können Fe^{2+} -Ionen die Bildung von Superoxidradikalen ($O_2^{\bullet-}$) induzieren (Mead 1976):



Dabei ist sekundär in Gegenwart von Wasserstoffperoxid eine Bildung von Hydroxylradikalen über die Haber-Weiss-Reaktion möglich (Haber und Weiss 1932):



1.2.4 Radikalbildende Umweltgifte

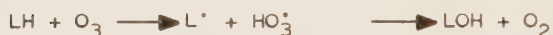
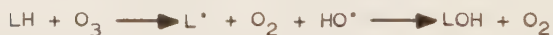
Eine weitere Möglichkeit der Radikalbildung im

Organismus ist durch verschiedene Bestandteile der Luft gegeben:

a) Stickoxide: Stickoxide haben global gesehen in der Luft eine Konzentration von etwa 0,2 ppm (Pryor 1976). Bei NO und NO₂ handelt es sich um Radikale, die stabil genug sind, um auch in relativ hohen Konzentrationen vorzukommen. NO₂ reagiert mit Alkenen unter Addition oder unter Entzug eines Wasserstoffatoms (Pryor 1976; Pryor und Lightsey 1981):



b) Ozon: Schon niedrige Konzentrationen von Ozon (0,02 ppm) verursachen die Autoxidation von ungesättigten Fettsäuren. Im Zusammenhang mit diesen Reaktionen treten Radikale auf (Pryor 1976):



c) Singletsauerstoff: Bei Singletsauerstoff (O₂^{*}) handelt es sich um ein Sauerstoffmolekül, dessen Valenzelektronen sich in einem angeregten Zustand befinden. Diese Moleküle besitzen die Neigung mit einer großen Zahl von organischen Verbindungen in Additionsreaktionen Radikale zu bilden (Dumelin et al. 1978; Politzer et al. 1971; Pryor 1976).

1.2.5 Radikalbildung durch halogenierte Kohlenwasserstoffe

Als Ursache für die toxischen Eigenschaften von halogenierten Kohlenwasserstoffen wird in der Literatur deren Fähigkeit zur Radikalbildung aufgeführt. Bekannte Radikalbildner sind CCl₃H (Chloroform), CCl₄, CCl₃Br und bromierte Methan-

derivate (Gee und Tappel 1981; Kähn 1984; Pryor 1976; Recknagel et al. 1977). Auch Halothan und Enfluran führen im Organismus zur Entstehung von Radikalen (Gienger 1982; Kreuzer 1982; Langner 1984; Reynolds und Moslen 1980).

1.2.6 Enzymatische Radikalbildung

Verschiedene Enzyme erzeugen Radikale, die von der Enzymoberfläche abdiffundieren, bevor sie inaktiviert werden (Pryor 1976). Als Quelle von Superoxidradikalen sind die Xanthinoxidase, die Aldehydoxidase und eine Reihe von Cytochromen bekannt (Fridovich 1976; McCord 1979; Mead 1976; Nohl 1981).

Bei der Xanthinoxidase handelt es sich um ein Flavoenzym, das im Cytosol aller Körperzellen vorkommt. Besonders groß ist ihre Aktivität jedoch in den Leberzellen und in der Darmmukosa (Swaminathan und Lower 1978). Im Stoffwechsel katalysiert die Xanthinoxidase die Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin. Dabei dient Sauerstoff als Kosubstrat (Buddecke 1977; Karlson 1980):



Bei dieser Reaktion kommt es zur Freisetzung von Superoxidradikalen, wenn nur ein Elektron auf das Sauerstoffmolekül übertragen wird (Bus und Gibson 1979; McCord 1979).

Die Xanthinoxidase kann durch Allopurinol gehemmt werden (Swaminathan und Lower 1978). Eine Induktion dieses Enzyms ist durch Xanthin möglich (Schmid 1984).

Die Aldehydoxidase, die hauptsächlich im Cytosol von Hepatocyten vorkommt, ist ebenfalls ein Flavoenzym (Buddecke 1977; Swaminathan und Lower 1978). Im Stoffwechsel ist die Aldehydoxidase am Abbau von Serotonin und Adrenalin beteiligt. Der Stoffumsatz durch die

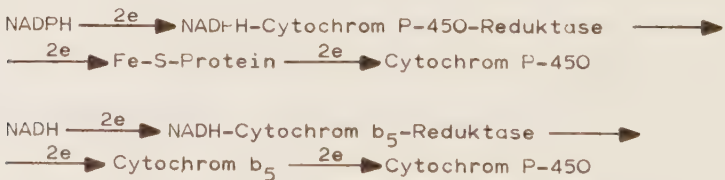
Aldehydoxidase läuft nach folgendem Schema ab (Buddecke 1977):



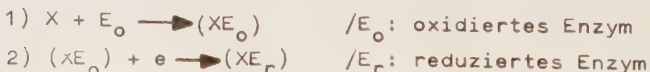
Wie bei der Xanthinoxidase kann es auch hier zur Freisetzung von Superoxidradikalen kommen, wenn nur ein Elektron auf das Sauerstoffmolekül übertragen wird (Bus und Gibson 1979; McCord 1979).

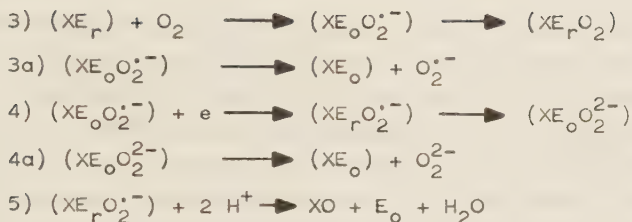
Als wichtigste Erzeuger von $\text{O}_2^{\cdot-}$ werden jedoch in der Literatur verschiedene Cytochrome aufgeführt (McCord 1979). Cytochrome sind Enzyme, die bei der biologischen Oxidation mitwirken. Unter Valenzwechsel des in einem Porphyrinring gebundenen Eisens übertragen sie Elektronen (Karlson 1980). Cytochrome kommen als Bestandteil des mikrosomalen Hydroxylierungssystems vor allem im glatten endoplasmatischen Retikulum der zentrilobulären Hepatozyten vor. Hier werden körperfremde Stoffe (Xenobiotica) metabolisiert (Johnson 1976; Karlson 1980; Schmid 1982; Stier 1976).

Die Monooxygenasen stellen Enzymketten dar, die Elektronen von NADPH oder NADH auf das terminale Cytochrom P-450 übertragen (Schenkman und Gibson 1981):



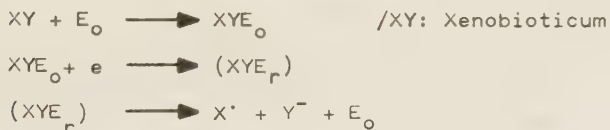
Das terminale Cytochrom P-450 reagiert auf folgende Weise mit einem Xenobioticum (X) (Schenkman und Gibson 1981):





Während dieser Reaktionen treten Superoxidradikale und Peroxide auf, deren Bildung bei Elektronenüberschuß begünstigt ist (Schmid 1982).

Durch das Cytochrom P-450 ist auch eine reduktive Spaltung eines Xenobiotiums möglich (McCay et al. 1980):



Die Biosynthese von mikrosomalen Enzymen kann durch eine Reihe von Substanzen (z. B. Phenobarbital) stimuliert werden (Thurman et al. 1980). Eine Hemmung läßt sich beispielsweise mit Piperonylbutoxid erreichen (Graham et al. 1970).

1.3 Radikalreaktionen im Organismus

Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Membranlipide sind gegenüber den Radikalen besonders empfindlich, da sie eine Divinylmethanstruktur besitzen, an deren Methylen-Gruppe atomarer Wasserstoff wegen der benachbarten Doppelbindungen besonders leicht abgespalten werden kann (Mead 1976):



Das Lipidradikal (L[•]) kann auf verschiedene Weise weiter-

reagieren. Häufig kommt es durch Umlagerung der Doppelbindung zur Bildung eines konjugierten Diens. Weiterhin kann sich ein Sauerstoffmolekül anlagern, so daß ein Peroxidradikal entsteht. Dieses ist dann in der Lage mit einer weiteren ungesättigten Fettsäure (LH) zu reagieren. Nach der Initiation von Radikalen kommt es auf diese Weise zu einer Kettenreaktion (Propagation) in deren Verlauf sich Lipidhydroperoxide und andere Reaktionsprodukte im Organismus anreichern (Bus und Gibson 1979; Dahle et al. 1962; Mead 1976):

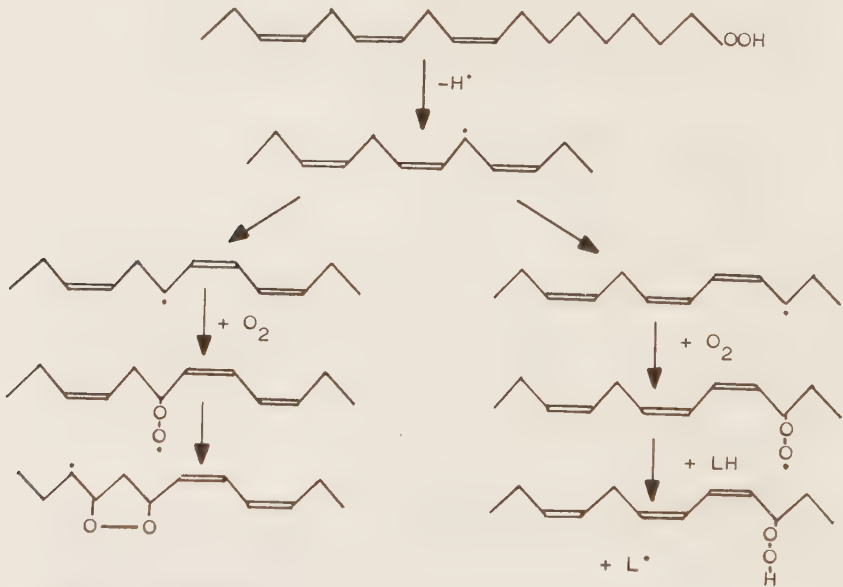


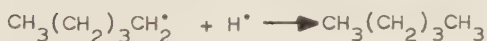
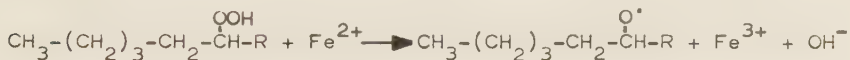
Abb. 1: Entstehung von Lipidperoxiden

Die Radikalkettenreaktionen können durch sogenannte Terminationsreaktionen zum Stillstand kommen (Barber und Bernheim 1967; Bus und Gibson 1979; Mead 1976):



Welche dieser drei Reaktionen in erster Linie abläuft, hängt vom Sauerstoffgehalt des Mediums ab (Pryor 1976).

Von Lipidperoxiden können durch weitere Reaktionen kurzkettige Kohlenwasserstoffe abgespalten werden. Es handelt sich dabei vor allem um Ethan, Pentan, Ethen und verschiedene andere Verbindungen. Es wurde festgestellt, daß Pentan von ω -6-ungesättigten Fettsäuren abgespalten wird (Linolsäure und Arachidonsäure). Ethan hat seinen Ursprung in ω -3-ungesättigten Fettsäuren. Nachfolgend wird die Erzeugung von Pentan beschrieben; die Ethanbildung erfolgt analog (Tappel und Dillard 1981; Dumelin und Tappel 1977):



Ethen kann u. a. aus Ethanradikalen in Gegenwart von Kupferionen gebildet werden (Dumelin und Tappel 1977; Gee und Tappel 1981):



Ein weiteres Produkt, das bei Kettenreaktionen entsteht, ist Malondialdehyd. Dieses Molekül wird aus zyklischen Endoperoxiden der Fettsäuren gebildet (Dahle et al. 1962; McCay et al. 1981; Niehaus und Samuelsson 1968):

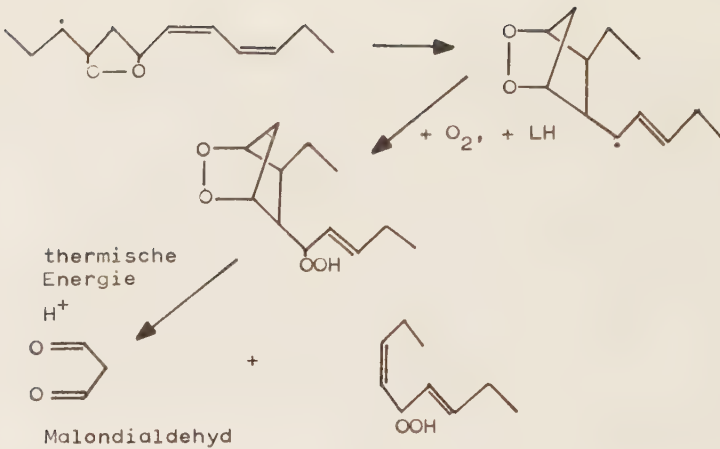


Abb. 2: Entstehung von Malondialdehyd

Ethan, Pentan und Ethen werden über die Expirationsluft ausgeschieden. Malondialdehyd kann im Organismus abgebaut werden (Siu und Draper 1982).

1.4 Biologische Radikalwirkung

Radikale können in der Zelle sehr vielfältig mit den verschiedensten organischen Molekülen reagieren. Ebenso komplex ist deshalb ihre Schädigung auf biologische Systeme.

Zusammen mit ungesättigten Fettsäuren kommt es zu Peroxidbildung, Kettenspaltungen und Vernetzung. Dadurch werden zelluläre und subzelluläre Membranen geschädigt. Dies führt zum Ausgleich von Konzentrationsgefällen und zur Freisetzung von in Kompartimenten angereicherten Stoffen. Die freigesetzten hydrolytischen Enzyme der Lysosomen verursachen weitere Schaden in Form einer Autodigestion (Bus und Gibson 1979; Tappel 1973).

Die Kettenreaktionen breiten sich innerhalb der Membran aus. Dadurch kommt es auch bei membrangebundenen Enzymen zu Strukturveränderungen, Schäden an einzelnen Aminosäuren, Polymerisationen und Aktivitätsverlust (Gardner 1979; Hochstein und Jain 1981; Tappl 1973). Das Spaltprodukt Malondialdehyd kann mit Aminogruppen eine Verbindung eingehen und damit auch zur Vernetzung von Eiweißmolekülen führen. Es entstehen dabei sogenannte konjugierte Schiff'sche Basen ($-\text{NH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{N}-$), die auch in Alterspigmenten (Lipofuszin, Ceroid) zu finden sind (Mead 1976). Verknüpfungen zwischen Lipiden und Proteinen sind ebenfalls bekannt (Hochstein und Jain 1981).

Andere Angriffspunkte der Radikale und deren Reaktionsprodukte sind die DNA-Repair-Enzyme und die RNA-Transcription. Auf diese Weise können Radikale zur Mutation oder Neoplasmaabildung führen (Bus und Gibson 1979; Nohl 1981).

An der Zelle findet man Veränderungen wie Mitochondrienlysis, Auflösung von Ribosomen, Zerstörung von Lysosomen und Lysis der gesamten Zelle (Bus und Gibson 1979).

Pathologisch-anatomisch werden als Folgen der Radikalkwirkung Hämolyse, Lungenödem, Muskelatrophie, Lebernekrosen, Enzephalomalazie und Hodenatrophie beobachtet (McCay 1981; Plaa und Witschi 1976). Auch Alterungsprozesse von Erythrozyten und der Haut werden auf Radikalreaktionen zurückgeführt (Hochstein und Jain 1981).

1.5 Biologische Schutzmechanismen

1.5.1 Sauerstoffpartialdruck

Der relativ niedrige Sauerstoffpartialdruck im Gewebe verhindert eine stärkere Schädigung oxidationsempfindlicher, zellulärer Strukturen. Es wird durch diese Situation die spontane Radikalbildung als Folge der Reduktion des Sauerstoffs begrenzt. Durch die verminderte Bildung von Lipidperoxiden kommt es auch zu einer weniger ausgeprägten Radikalpropagation (Barber und Bernheim 1967).

1.5.2 Membranstruktur

Die Membranstruktur bietet einen gewissen Schutz vor einer radikalischen Schädigung. Die Elektronentransportketten, in denen Radikale entstehen sind eng gekoppelt und an die Membranen gebunden. Radikalische Intermediärprodukte werden daher nicht freigesetzt, sondern schnell an das nächste Enzym weitergegeben und inaktiviert (Demopoulos 1973a).

Weiterhin wirkt sich günstig aus, daß sich die besonders empfindlichen Regionen der ungesättigten Fettsäuren im Inneren der Lipidschicht befinden und dadurch vor Radikalen, die vor allem in der wässrigen Phase der Zelle erzeugt werden, geschützt sind (Bus und Gibson 1979; Demopoulos 1973b).

1.5.3 Antioxidantien

Einen weiteren Schutz des Organismus vor der Wirkung von Radikalen bieten Antioxidantien. Es handelt sich dabei um Substanzen, die selbst sehr leicht oxidiert werden können. Auf diese Weise unterbrechen sie die Radikalkettenreaktionen.

Es sind wasserlösliche Antioxidantien bekannt wie zum Beispiel Vitamin C, sowie fettlösliche Wirkstoffe wie die verschiedenen Tocopherole (Bus und Gibson 1979; Ginter et al. 1982; Fukuzawa et al. 1982). Die größte Bedeutung besitzt α -Tocopherol (Vitamin E). Seine antioxidative Wirkung wurde von vielen Autoren nachgewiesen (Dumelin et al. 1978; Dillard und Tappel 1979; Di Luzio 1973; Flamigni et al. 1982; Fukuzawa et al. 1982; Gee und Tappel 1981; Hafeman und Hoekstra 1977; Herschberger und Tappel 1982; King et al. 1975; Sevanian et al. 1982; Tappel und Dillard 1981). α -Tocopherol ist in den Lipidmembranen angereichert, in denen Radikalkettenreaktionen ablaufen können. Vitamin E (α TH) wird durch Radikale zu einem

Chinon (α TQ) oxidiert (Bus und Gibson 1979):



Oxidiertes Vitamin E kann durch Glutathion (GSH) wieder reduziert werden. Dadurch ist eine große Effektivität gewährleistet (Bus und Gibson 1979; Fryor 1976):



Als weitere Substanzen mit antioxidativer Wirkung gelten β -Carotin, Vitamin A, Ubichinon und reduziertes Glutathion (Kunert und Tappel 1983; Slater 1972). Auch Vitamin C schützt vor einer Oxidation. Zusammen mit Eisenionen kann es jedoch das Gegenteil bewirken und die Entstehung von Superoxidradikalen hervorrufen (Ginter et al. 1982; Kunert und Tappel 1983; Nohl 1981):



Es gibt auch synthetische Produkte mit antioxidativer Wirkung. Ein Beispiel hierfür ist N,N'-Diphenyl-p-phenylen-diamin (DPPD) (Di Luzio 1973).

1.5.4 Enzymsysteme

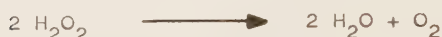
Enzyme wie Peroxidasen, Katalase und Superoxiddismutasen haben eine wichtige Schutzfunktion vor Radikalen und deren Reaktionsprodukten.

Peroxidasen und Katalase inaktivieren Peroxide. Die Peroxidase ist relativ substratspezifisch und benötigt ein oxidierbares Kosubstrat. Von größter Bedeutung ist

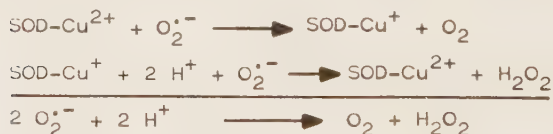
die selenhaltige Glutathionperoxidase. Sie reduziert u. a. Lipidhydroperoxide zu Alkoholen. Als Kosubstrat wird Glutathion (GSH) verwendet (Chance et al. 1979; Bus und Gibson 1979; Kosower und Kosower 1976):



Katalase reagiert spezifisch mit Wasserstoffperoxid. Sie entzieht die zur Reduktion notwendigen Elektronen dem Substrat selbst (Chance et al. 1979):



Das Enzym Superoxiddismutase (SOD) wandelt Superoxidionen zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid um. An SOD sind Kupfer- und Zinkionen reversibel gebunden. Die Elektronenübertragung wird von den Kupferionen bewerkstelligt. Zn^{2+} wirkt wahrscheinlich nur stabilisierend auf das Enzym (Bus und Gibson 1979; Nohl 1981):



Die Biosynthese von SOD kann durch Sauerstoff induziert werden. Der Organismus erhält dadurch eine gesteigerte Resistenz gegen erhöhte Sauerstoffkonzentrationen (McCord 1979).

Es sind auch Superoxiddismutasen bekannt, die Eisen- oder Manganionen enthalten (Fridovich 1976; McCord 1979; Nohl 1981).

1.6 Nachweis von Radikalen und deren Reaktionsprodukten

Der Nachweis von Radikalen und deren Reaktionsprodukten ist sowohl in vivo als auch in vitro möglich. Zur

Bestimmung der Radikalwirkung gibt es folgende Methoden:

1. Nachweis kurzkettiger Kohlenwasserstoffe:

Bei der Lipidperoxidation durch Radikale entstehen kurzkettige Kohlenwasserstoffe wie Ethan, Pentan und Ethen, die in der Expirationsluft mit dem Gaschromatographen nachgewiesen werden können (Bus und Gibson 1979; Dillard et al. 1977; Dillard und Tappel 1979; Dumelin et al. 1978; Dumelin und Tappel 1977; Gee und Tappel 1981; Herschberger und Tappel 1983; Schmid und Christoph 1980; Tappel und Dillard 1981).

2. Thiobarbitursäure-(TBA)-Methode:

Es wird die Entstehung von Malondialdehyd nachgewiesen. Malondialdehyd reagiert mit 2 Molekülen Thiobarbitursäure und bildet einen Farbstoff mit maximaler Absorption bei 535 nm (Barber und Bernheim 1967; Dahle et al. 1962; Mead 1976; Ottolenghi 1959).

3. Bestimmung der Glutathionkonzentration:

Oxydiertes Glutathion wird vom Körper über die Galle ausgeschieden. Der Abfall der Glutathionkonzentration in der Leber ist damit eine Folge der Radikalreaktionen (Bartoli und Sies 1978; Chance et al. 1979; Ellman 1959).

4. Jodometrie:

Durch Lipidperoxide kann im sauren Medium Jodid zu Jod oxidiert werden. Der Nachweis des gebildeten Jods erfolgt durch die Titration mit Thiosulfat (Barber und Bernheim 1967; Dahle et al. 1962).

5. Warburg-Methode:

Ein weiterer Nachweis der Radikalwirkung kann durch die Messung der Sauerstoffabsorption von Gewebeproben erfolgen. Durch die Lipidperoxidbildung in den Gewebeproben wird Sauerstoff verbraucht. Die Bestimmung des Verbrauchs erfolgt direkt über den Druckabfall im Reaktionsgefäß (Dahle et al. 1962).

6. UV-Spektralphotometrie:

Konjugierte Diene, die bei der Lipidperoxidation entstehen, zeigen ein Absorptionsmaximum bei 233 nm und

können damit photometrisch bestimmt werden (Barber und Bernheim 1967; Dahle et al. 1962; Kanner und Kinsella 1983).

7. Fluoreszenz-Spektroskopie:

Als Endprodukte der radikalischen Schädigung entstehen im Organismus u. a. Schiff'sche Basen. Diese Verbindungen können auf Grund ihrer Fluoreszenz nachgewiesen werden (Dillard und Tappel 1971; Dillard und Tappel 1973; Seligman et al. 1977; Tappel 1973).

8. Chemilumineszenz:

Bestimmte Radikalreaktionen führen zur Bildung von angeregten Molekülen. Diese können ihr energetisches Grundniveau erreichen, indem sie Photonen abgeben. Organe und Gewebeproben, die einer radikalischen Schädigung unterliegen, geben Photonen ab, die auf die genannte Weise entstanden sind. Zum Nachweis der einzelnen Lichtquanten wird ein Photomultiplier eingesetzt (Boveris et al. 1981).

9. Elektromagnetische Spin-Resonanz-(ESR)-Technik:

Der direkte Nachweis von Radikalen ist durch die ESR-Technik möglich. In Folge der unpaarigen Elektronen besitzen Radikale paramagnetische Eigenschaften. Mit der genannten Methode wird die magnetische Resonanz der unpaarigen Elektronen erfaßt (Christen 1980; McCay et al. 1981; Okada 1970).

2 Nitrofurane

2.1 Bedeutung und Verwendung

Die antibakterielle Wirkung von 5-Nitrofuran-Derivaten wurde 1944 von Dodd und Stillman entdeckt. Unabhängig davon gaben 1947 auch Dann und Möller ihre Untersuchung über die antibakterielle Wirkung von verschiedenen Nitrofuranen bekannt. Die ersten Verbindungen dieser Wirkstoffgruppe, die zum klinischen Einsatz kamen, waren Nitrofurazon

(1944), Nitrofurantoin (1952) und Furazolidon (1953). Diese drei Präparate stellen auch heute noch die bekanntesten Nitrofuran-Derivate dar (Bryan 1978; Chamberlain 1976; Dann und Möller 1947; Dodd und Stillman 1944; McCalla 1979).

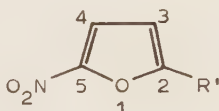
Zu Beginn der sechziger Jahre stieg die Zahl neuer Derivate sprunghaft an. Ebenso umfangreich wurde auch der Anwendungsbereich dieser Wirkstoffgruppe. Nifurprazin und andere 5-Nitrofuran-Derivate wurden in der Human- und Tiermedizin vor allem zur Bekämpfung von lokalen bakteriellen Infektionen sowie von Infektionen des Darmtraktes verwendet. Nitrofurantoin wird als Chemotherapeutikum zur Behandlung von Infektionen des Urogenitaltraktes herangezogen. Weiterhin erwiesen sich verschiedene Produkte als wirksam gegen Protozoen, Pilze, Hefen und Nematoden (Anonym 1976; Chatfield 1976; Hamilton-Miller und Brumfitt 1976; Junghanss 1966; McCalla 1979; Wegner und Rohwedder 1972). In den fünfziger Jahren erkannte man auch die Wirksamkeit von Nitrofuranen bei der Chemotherapie von Tumoren (Hayllar et al. 1960).

In Japan und der CSSR verwendete man Nitrofurane wie AF-2 und 5-Nitrofuryl-acetylsäure zur Konservierung von Lebensmitteln (Farkas 1975; Miyaji 1971; Tatsumi et al. 1975b). Eine größere Verbreitung fand die Verwendung von Furazolidon und Nihydrazon als Zusatzstoff für Futtermittel (Bryan 1978).

In den sechziger Jahren wurden Hinweise für eine mutagene und kanzerogene Wirkung einzelner Produkte dieser Wirkstoffgruppe bekannt. Bestimmte Nitrofuran-Derivate erwiesen sich sogar als effektive experimentelle Kanzerogene. Wegen dieser Erkenntnisse gab man die Verwendung der Nitrofurane als Konservierungsmittel auf. Die Präparate für den klinischen Einsatz unterzog man wiederholten Prüfungen auf mögliche mutagene und kanzerogene Eigenschaften. Ein Teil der Nitrofurane (z. B. Nifurprazin und NFTA) wurde darauf vom Markt zurückgezogen (Cohen 1978; Klemencic und Wang 1978).

2.2 Physikalische und chemische Eigenschaften

Nitrofurane sind eine Gruppe synthetischer Chemo-therapeutika. Es handelt sich dabei um gelbliche, bitter schmeckende und lichtempfindliche Substanzen. Für ihre antibakterielle Wirkung ist die NO_2 -Gruppe am C_5 des Furanringes verantwortlich (Otten und Plempel 1975):



Durch die zwei Doppelbindungen und die zwei freien Elektronenpaare am Sauerstoff besitzt der Furanring aromatischen Charakter. Substituenten, die dem Ring Elektronen entziehen ($-\text{NO}_2$, $-\text{COOH}$, CHO , $-\text{SO}_3\text{H}$), stabilisieren den Furanring gegenüber der Einwirkung von mineralischen Säuren. Durch Substituenten, die dem Ring weiter Elektronen zuführen ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OH}$), wird der Dienäther-Charakter des Furans gefördert. Eine Ringspaltung durch Hydrolyse wird dadurch im sauren Bereich ermöglicht (Ichikawa 1978).

Die verschiedenen 5-Nitrofuran-Derivate unterscheiden sich chemisch in ihrer Seitenkette R' . Die Vielzahl der Nitrofurane kann je nach Substituent am C_2 des Furanringes in vier Gruppen eingeteilt werden (Yahagi et al. 1974):

1. Nitrofurane mit heterozyklischer Seitenkette:

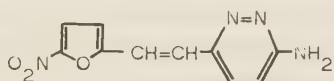
Bei den Nitrofuranen dieser Gruppe befindet sich am C_2 des Furanringes ein heterozyklischer Rest. Von größter Bedeutung sind hierbei die Verbindungen, die einen Thiazolring beinhalten (Bryan 1978; Cohen 1978):



Zu den Verbindungen dieser Gruppe gehören FANFT, ANFT, NFTA und FNT. Die genannten Substanzen unterscheiden sich durch den Substituenten R" (Cohen 1978; McCalla 1979).

2. Nitrofurane mit Vinylgruppe:

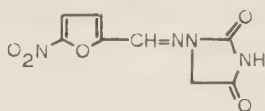
Bei diesen Nitrofuranen beginnt die Seitenkette an der Position 2 des Furanringes mit einer Vinylgruppe. Als Beispiel hierfür soll Nifurprazin (6-Amino-3-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]-1;2-diazin) genannt werden (Bryan 1978; McCalla 1979):



Weitere Vertreter dieser Gruppe von Nitrofuranen sind AF-2, Panfuran und SQ 18506 (Bryan 1978; McCalla 1979).

3. Nitrofurane mit Azomethingruppe:

Für diese Nitrofurane ist die Azomethingruppe (-CH=N-) am C₂ des Furanringes charakteristisch. Als einer der wichtigsten Vertreter gilt Nitrofurantoin (1-[(5-Nitrofurfuriliden)amino]hydantoin) (Bryan 1978; McCalla 1979):



Die meisten der gebräuchlichen Nitrofurane sind hier einzuordnen. Dazu gehören zum Beispiel Nitrofurazon, Furazolidon, Nihydrazon und Furaltadon (Bryan 1978).

4. Sonstige Nitrofurane:

Hier werden alle Nitrofurane eingeordnet, die nicht zu den Gruppen 1-3 passen. Es sind in erster Linie die

Verbindungen mit einer einfachen Seitenkette, wie Nitro-furan, Nitrofuraldehyd und Nitrofuransäure. Ihre Bedeutung haben sie als Ausgangsprodukt für die Synthese von therapeutisch genutzten Nitrofuranen (Bryan 1978; McCalla 1979).

Nitrofurane besitzen nur eine geringe Löslichkeit in Wasser und Ethanol. In Dimethylformamid ist das Lösungsvermögen gut. Das Schmelzen der Nitrofurane erfolgt bei den hier aufgeführten Derivaten unter Zersetzung (Beckett und Robinson 1959a; Beckett und Robinson 1959b; Chamberlain 1976; Otten und Plempel 1975):

Tab. 1: Physikalische Eigenschaften von Nitrofurantoin und Nifurprazin-HCl

	P in °C	Molekül- masse	λ max.	Löslichkeit (μ g/ml)		
				a	b	c
Nitrofurantoin	270-271	238,16	270 375	190	510	80000
Nifurprazin-HCl	290	305,16				

a: Wasser; b: Ethanol; c: Dimethylformamid;
 λ max: Absorptionsmaxima in nm; P: Schmelzpunkt

Eine wichtige chemische Eigenschaft der Nitrofurane ist ihre Fähigkeit, Elektronen aufzunehmen. Die antibakterielle Wirkung steht mit dieser Reaktionsmöglichkeit im Zusammenhang (Ichikawa 1978).

2.3 Stoffwechselverhalten

2.3.1 Resorption, Verteilung und Ausscheidung

Der Umfang der Resorption von Nitrofuranen nach oraler Applikation hängt von ihrer Wasserlöslichkeit ab (Tatsumi et al. 1973). Die Nitrofuran-Derivate sind im Verdauungstrakt nur zum Teil gelöst. Von den gelösten Nitrofuranen wird vom Verdauungstrakt wiederum nur ein Teil resorbiert (Tatsumi et al. 1973).

Nitrofurantoin wird nach oraler Applikation vor allem durch den Dünndarm aufgenommen. Wirksame Blutspiegel werden jedoch nicht erreicht (Otten und Flempel 1975).

Nifurprazin wird bei lokaler Anwendung nach Verletzungen und Verbrennungen nur minimal resorbiert. Im Serum ist in der Regel kein Nifurprazin nachweisbar (Junghanss 1960).

Die Überprüfung der Verteilung von Nitrofuranen in verschiedenen Körperflüssigkeiten hat gezeigt, das diese Produkte sich an Plasmaproteine binden können. Die einzelnen Nitrofurane unterscheiden sich dabei sehr stark in ihrer Bindungsfähigkeit. Anionische Derivate (Nitrofurantoin) sind zwischen 50% und 90% an Serumproteine gebunden. Kationische Nitrofurane (Nifurprazin) werden dagegen kaum gebunden. Nicht-ionische Derivate (Nitrofurazon, Furazolidon) nehmen mit etwa 30% eine Mittelstellung ein (Swaminathan und Lower 1978).

Wie hoch die erreichbaren Konzentrationen von Nitrofuranen im Blut und im Gewebe sind, wird nicht nur durch den Umfang und die Geschwindigkeit der Resorption, sondern auch durch die Geschwindigkeit der Ausscheidung beeinflusst (Swaminathan und Lower 1978). Die Eliminationshalbwertszeit von Nitrofurantoin liegt beim Menschen etwa bei 20 Minuten (Otten und Flempel 1975).

Die Ausscheidung von Nitrofurantoin erfolgt in erster Linie über die Niere durch glomeruläre Filtration. Es erfolgt sowohl eine tubuläre Sekretion als auch Rückresorption. Die renale Clearance wird durch den pH-Wert beeinflusst (Chamberlain 1976; Otten und Flempel 1975). Durch die Ausscheidung über die Niere werden im Urogenitaltrakt antibakteriell wirksame Konzentrationen erreicht. Bei Ratten werden bis zu 52% des oral verabreichten Nitrofurantoins im Urin aufgefunden (Swaminathan und Lower 1978). Nifurprazin ist in der Regel im Urin nicht nachweisbar (Junghanss 1960).

In den Faeces sind beim Menschen etwa 2-4% des oral applizierten Nitrofurantoins zu finden (Otten und Flempel 1975; Paul et al. 1960).

Die Applikation von Nitrofuranen führt nach bisherigen Erkenntnissen zu keiner relevanten Rückstandsbildung (Palermo und Gentile 1975; Paul et al. 1960; Petz 1983; Tapernoux et al. 1964).

2.3.2 Metabolisierung

Im Organismus werden 5-Nitrofuran-Derivate von Enzymen auf verschiedenem Wege umgewandelt. Zum Teil sind die Intermediärprodukte wegen ihrer Instabilität nur schwierig zu identifizieren (Swaminathan und Lower 1978). Die Umwandlung von Nitrofuranen kann durch folgende Reaktionsschritte erfolgen:

1. Reduktion der Nitrogruppe:

Bei der Reduktion der Nitrogruppe im Organismus werden Elektronen in mehreren Stufen auf das Molekül übertragen. Falls im ersten Schritt nur ein Elektron übertragen wird, führt dies zur Bildung eines Nitroanionenradikals ($R-NO_2^{\cdot-}$). Unter den Enzymen, die die Nitrogruppe reduzieren können, sind die Xanthinoxidase, die Aldehydoxidase und die mischfunktionellen Monooxygenasen von Bedeutung (Swaminathan und Lower 1978).

Die Xanthinoxidase kommt im Cytosol vor und setzt als Substrat Hypoxanthin, Xanthin oder NADH um. Als Kosubstrat kann sie statt Sauerstoff auch Nitrofuranmoleküle verwenden (Taylor et al. 1951):



Die Metabolisierung von Nitrofuranen durch die Xanthinoxidase läßt sich durch Allopurinol oder Sauerstoff hemmen (Paul et al. 1960; Swaminathan und Lower 1978; Tatsumi et al. 1976b; Taylor et al. 1951; Wang et al. 1974).

Die Aldehydoxidase ist ein weiteres Enzym, das im Cytoplasma vorkommt. Sie läßt sich weder durch Allopurinol, noch durch Kohlenmonoxid hemmen (Swaminathan und Lower 1978). Die Reduktion von Nitrofuranen durch die

Aldehydoxidase läuft nach folgendem Schema ab (Wolpert et al. 1973):



Bei den verschiedenen Tierarten sind die Xanthinoxidase und die Aldehydoxidase zu einem unterschiedlichen Teil an der Nitroreduktion beteiligt (Wolpert et al. 1973):

Tab. 2: Nitroreduktaseaktivität der Xanthinoxidase und der Aldehydoxidase in den Leberzellen verschiedener Tierarten

	Xanthinoxidase	Aldehydoxidase
Ratte	77 %	23 %
Kaninchen	0 %	100 %
Meerschweinchen	54 %	46 %
Maus	73 %	27 %
Hamster	45 %	55 %

Für die Reduktion der Nitrogruppe durch die mikrosomalen Enzyme ist vor allem die NADPH-Cytochrom c Reduktase verantwortlich. Das Cytochrom P-450 ist hier von geringerer Bedeutung (Wang et al. 1974). Die NADPH-Cytochrom c Reduktase setzt NADPH als Substrat um. Die Reduktase kann zum Teil durch Sauerstoff, aber nicht durch Allopurinol oder Kohlenmonoxid gehemmt werden. Eine Enzyminduktion ist durch Phenobarbital zu erreichen (Swaminathan und Lower 1978; Tatsumi et al. 1976b; Wang et al. 1974). Die Reduktion der Nitrofurane durch die mikrosomalen Monooxygenasen kann nach folgendem Schema ablaufen (siehe 1.2.6):



Die Nitroreduktaseaktivität des Cytosols und der Mikrosomenfraktion von Leberzellen besitzt deutliche tierartige Unterschiede (Wolpert et al. 1973):

Tab. 3: Mikrosomale und cytosolische Nitroreduktaseaktivität bei verschiedenen Tierarten

	mikrosomale Aktivität	cytosolische Aktivität
Ratte	66 %	34 %
Kaninchen	71 %	29 %
Meerschweinchen	85 %	15 %
Maus	64 %	36 %
Hamster	72 %	28 %

Bei Anwesenheit von Sauerstoff kann es durch die Rückreaktion des Nitroanionenradikals zur Bildung von $O_2^{\cdot-}$ kommen (Biaglow et al. 1976; Mason und Holtzman 1975a; Mason und Holtzman 1975b):



Die weitere Reduktion des Nitroanionenradikals durch die genannten Enzyme läuft in mehreren Stufen über die Bildung einer Nitrosogruppe, eines Hydroxylamins und schließlich einer Aminogruppe ab (Akao et al. 1971; Ebetino et al. 1961; Herrett et al. 1967; Olivard et al. 1962; Paul et al. 1960 Taylor et al. 1951):



Das Endprodukt der Reduktion – die Aminogruppe – kann mit einem oder zwei Molekülen Essigsäure acetyliert werden. Auch die Spaltung des Furanringes unter Bildung eines Nitrils wurde nachgewiesen (Chatfield 1976; Olivard et al. 1976; Sies und Cadenas 1983):





Bei Bakterien läuft die metabolische Umwandlung von 5-Nitrofuran-Derivaten in ähnlicher Weise ab wie beim Säugetier. Im Vordergrund steht ebenfalls die enzymatische Reduktion der Nitrogruppe.

Die Enzyme, die für die Reduktion verantwortlich sind, wurden bei *Escherichia coli* näher untersucht. Bei diesem Mikroorganismus kann man eine Reduktase I und eine Reduktase II unterscheiden (McCalla et al. 1975).

Die Reduktase I besitzt eine Molekülmasse von etwa 500000 und wird durch Sauerstoff nicht gehemmt. Als Kofaktor benötigt sie NADPH (McCalla et al. 1975).

Die Reduktase II wird durch Sauerstoff gehemmt. Sie reduziert Nitrofurane nur unter anaeroben Bedingungen. Dieses Enzym besteht aus zwei Komponenten mit den Molekülmassen 120000 und 700000 (McCalla et al. 1975).

Bei Bakterien wurden ebenfalls Nitrile beobachtet, die durch die Ringöffnung von reduzierten Nitrofuranen entstehen (Beckett und Robinson 1959a; Beckett und Robinson 1959b; Loewe 1972; Gavin et al. 1966; Wieglepp et al. 1973).

Nach der oralen Applikation von Nitrofuranen spielt die Metabolisierung durch die Darmbakterien vermutlich keine große Rolle (Tatsumi et al. 1973).

2. Hydrolyse der Azomethingruppe:

Der Abbau von Nitrofuranen kann neben der Reduktion der Nitrogruppe auch durch die Hydrolyse der Azomethingruppe eingeleitet werden. Die hydrolytische Spaltung erfolgt vorwiegend im sauren Bereich (Magen). Der entstehende Nitrofuraldehyd kann zur Säure oxidiert werden und sich mit Glycin konjugieren (Paul et al. 1949; Paul et al. 1960):

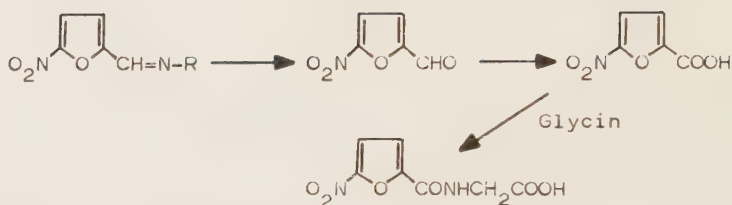


Abb. 3: Spaltung der Azomethingruppe

3. Cis-trans-Isomerisation der Vinylgruppe:

Cis-trans-Isomerisationen können in der Vinylgruppe am C₂ des Furanringes erfolgen. Diese Umwandlung wurde bei der Metabolisierung von AF-2 beobachtet (Tatsumi et al. 1976a):



Abb. 4: Cis-trans-Isomerisation der Vinylgruppe bei AF-2

Es wird vermutet, daß für die Cis-trans-Isomerisation die Bildung eines Nitrouanionenradikals notwendig ist. In diesem Zustand ist die Aktivierungsenergie für die Isomerisation erniedrigt (Clarke et al. 1984a; Clarke et al. 1984b).

4. Hydroxylierung des Furanringes:

Eine Hydroxylierung des Furanringes am C₄ wiesen Olivard und Mitarbeiter nach. Diese Metaboliten wurden im Urin einer Reihe von Versuchstieren und des Menschen aufgefunden (Olivard et al. 1976).

5. Oxidation der Seitenkette:

Einfache Seitenketten von Nitrofuranen werden im allgemeinen rasch bis auf eine Carboxylgruppe oxidiert. Eine oxidative Spaltung der Seitenkette erfolgt bei komplexen Nitrofuranen nur selten (Swaminathan und Lower 1978).

2.4 Wirkung auf Bakterien

2.4.1 Antibakterielle Aktivität

Die 5-Nitrofuran-Derivate besitzen in niedrigen Konzentrationen einen bakteriostatischen Effekt. Durch höhere Konzentrationen kann eine bakterizide Wirkung erreicht werden (McCalla 1979). Das antibakterielle Wirkungsspektrum ist sehr breit. Im Gegensatz zu den Antibiotika treten im klinischen Gebrauch nur selten Probleme durch Resistenzbildung auf (Chamberlain 1976; Junghanss 1966):

Tab. 4: Antibakterielle Aktivität in vitro

	Minimale Hemmkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) Nitrofurantoin Nifurprazin	
Staph. aureus	6-12	0,031-0,25
Strept. pyogenes	3-12	0,016-0,25
Strept. faecalis	12-25	0,062-0,5
Clostridium spp.	-	0,001
Escherichia coli	6-200	0,008-0,062
Proteus spp.	100-200	0,125-16
Salmonella spp.	3-100	0,008-0,062

Der antibakterielle Wirkungsmechanismus der Nitrofurane ist sehr komplex.

Im Laufe der Umwandlung der Nitrogruppe treten Intermediärprodukte auf, die für die antibakterielle Wirkung verantwortlich sind. Die genaue chemische Identität des wirksamen Intermediärprodukts ist jedoch unbekannt. Das Aminofuran weist keine antibakteriellen Eigenschaften mehr auf (McCalla 1979).

Während der Reduktion der Nitrogruppe durch die Bakterien kommt es zur Hemmung verschiedener Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels wie Pyruvat-Dehydrogenase, Citrat-Synthase und Malat-Dehydrogenase (Chamberlain 1976). Reduktionsprodukte von Nitrofuranen verursachen weiterhin Strangbrüche an der bakteriellen DNA (McCalla et al. 1971; McCalla et al. 1975). Ebenso wird die Synthese aller Arten von RNA gehemmt. An den Ribosomen kommt es zu Funktionsstörungen. (Tu und McCalla 1976). Während für die Schädigung der DNA vor allem Reduktionsprodukte der bakteriellen Reduktase I verantwortlich sind, binden sich die Reduktionsprodukte der Reduktase II in erster Linie an Proteine (Asnis 1957; McCalla et al. 1975).

2.4.2 Resistenzbildung

Viele 5-Nitrofuran-Derivate besitzen mutagene Eigenschaften (McCalla 1979). Darauf weist auch die Fähigkeit zur Schädigung der DNA und zur Induktion der Phagenentwicklung hin (McCalla 1964; McCalla et al. 1971; McCalla und Voutsinos 1974; Tu und McCalla 1975; Waterbury und Freedman 1964).

Mutagene Substanzen verändern die Eigenschaften von Bakterien. Salmonellen, die Histidin für ihren Stoffwechsel benötigen, können durch Mutation die Unabhängigkeit von dieser Aminosäure erlangen. Dieser Vorgang kann zum Test auf mutagene Eigenschaften von zu untersuchenden Substanzen herangezogen werden (Ames-Test). Bei vielen Nitrofuranen kann durch diesen Test die Mutagenität nachgewiesen werden (Ames et al. 1975; Green et al. 1977; Joner et al. 1977; Rosenkranz 1977; Rosenkranz und Speck 1976; Wang und Lee 1976; Yahagi et al. 1976).

Mutationen können bei Bakterien auch zur Bildung einer Resistenz gegen Nitrofurane führen. Bei *Escherichia coli* kann gegen Nitrofurane eine Resistenzsteigerung in zwei Stufen um das Dreifache und um das Zehnfache beobachtet werden (multi-step-reaction). Diese Resistenzsteigerung

ist auf den schrittweisen Verlust der Aktivität der Reduktase I zurückzuführen. Ein zusätzlicher Verlust der Reduktase II wurde bisher nicht beobachtet. Dieses Enzym ist wahrscheinlich für den Bakterienstoffwechsel unentbehrlich (McCalla et al. 1978).

2.5 Wirkung auf Protozoen, Algen, Pilze und Hefen

Nitrofurane sind für eine Reihe von eukariontischen Mikroorganismen toxisch. Diese Eigenschaft wird auch bei der Therapie und Prophylaxe von Protozoeninfektionen ausgenutzt. Beispielsweise werden Nitrofurazon und Furazolidon Futtermitteln als Wirkstoff gegen Coccidien zugegeben. SQ 18506 und Nifurtimox sind wirksame Präparate zur Bekämpfung der akuten Infektion mit *Trypanosoma cruzi* (McCalla 1979; Wegner und Rohwedder 1972).

Bei *Euglena gracilis* führen die meisten Nitrofurane zum irreversiblen Verlust der Chromatophoren (McCalla 1962; McCalla 1979).

Eine Reihe von Nitrofuran-Derivaten wirkt hemmend auf die Entwicklung von Hefen und Pilzen. Bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora* verursachen verschiedene Nitrofurane Mutationen (Hein et al. 1973; McCalla 1979; Ong und Shahin 1974).

2.6 Nebenwirkungen

2.6.1 Wirkung auf Organe und Gewebe

Bei der oralen Applikation von Nitrofurantoin oder Furazolidon werden beim Menschen gelegentlich gastrointestinale Symptome wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall beobachtet. Diese Erscheinungen sind reversibel und klingen nach Absetzen des Medikamentes wieder ab (Chamberlain 1976; Cohen 1978; Otten und Plempel 1975).

Hautreaktionen kommen auf Grund einer Allergie gegen Nitrofurane vor. Bei einer lokalen Applikation auf die

Körperoberfläche ist dies im allgemeinen die einzige beobachtete Nebenwirkung (Cohen 1978; McCulla 1979). Nach lokaler Verabreichung von Nifurprazin auf großflächige Hautläsionen wurden von Junghanss (1966) keine Unverträglichkeitsreaktionen beobachtet.

Bei Patienten mit Mangel an Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase tritt häufig eine hämolytische Anämie auf (Chamberlain 1976).

Nitrofurane können an der Leber zu Zelldegenerationen und Fibrose führen. An der Lunge kann man akute und chronische Schäden unterscheiden. Im ersten Fall werden Fieber, Husten und Pleuritis beobachtet. Im zweiten Fall treten Lungenödem, Lungenfibrose und hyaline Membranen in den Alveolen auf (Cohen 1978).

Periphere Polyneuropathien sind eine schwerwiegende Nebenwirkung, die nicht immer reversibel ist. Sie äußert sich in Parästhesien, Sensibilitätsstörungen, Schmerzen und in Muskelatrophie in schweren Fällen. Periphere Polyneuropathien treten meistens bei Patienten mit renalen Ausscheidungsstörungen auf (Chamberlain 1976; Toole und Parish 1973).

Bei Versuchstieren wird während der Verabreichung von Nitrofuranen häufig ein verzögertes Wachstum und eine erhöhte Sterblichkeit beobachtet. Auch neurologische Symptome können auftreten. Sie äußern sich in Zittern, Übererregbarkeit und in Anfällen. Erbrechen, das beim Hund beobachtet wird, ist ebenfalls auf zentralnervöse Störungen zurückzuführen (Cohen 1978; Loewe 1972). Bei Ratten wird weiterhin Muskelatrophie und Nephritis, bei Mäusen eine Zerstörung der Talgdrüsen festgestellt (Cohen 1978). Eine Leberschwellung, die auf einer Vergrößerung der zentrilobulären Zellen beruht, tritt nur während der Applikation von Nitrofuranen auf und ist reversibel (Miyaji 1971).

2.6.2 Teratogenität und Einfluß auf die Fruchtbarkeit

Die teratogenen Eigenschaften von Nitrofuranen wurden bisher nur selten überprüft. Es können daher noch keine allgemeingültigen Aussagen über ihren Zusammenhang mit Mutagenität und Kanzerogenität gemacht werden. Bisher wurden nach alleiniger Gabe von Nitrofuranen an Versuchstiere keine Mißbildungen beobachtet. Nach Vorbehandlung mit Phenobarbital führt jedoch Furfurylramid zu Mißbildungen bei Mäusefeten (Nömura und Kondo 1976). Nitrofurane allein können ein verzögertes Wachstum und ein vermehrtes Absterben von Feten bewirken (Cohen 1978).

Nitrofurantoin hat beim Menschen in therapeutischen Dosen nur geringe Auswirkungen auf die Spermatogenese; die Veränderungen sind außerdem reversibel (Nelson und Bunge 1957). Bei männlichen Ratten hemmt Nitrofurazon dagegen die Spermatogenese, wobei eine längere Anwendung zur Hodenatrophie führt (Cohen 1978).

Nitrofurazon und Nidroxizon führten bei Ratten zu keinen morphologischen Veränderungen am Eierstock. Jedoch wird die Reproduktivität der Ratten stark eingeschränkt (Cohen 1978).

2.6.3 Mutagenität

Bei vielen Nitrofuranen konnten mutagene Eigenschaften nachgewiesen werden. Für diese Wirkung ist die Nitrogruppe am C₅ des Furanringes notwendig (Klemencic und Wang 1978; Tazima et al. 1975).

Nitrofurane verursachen bei Säugetierzellen eine Schädigung der DNA. Diese Schädigung erfolgt bei der Reduktion der Nitrogruppe und ist unter anaeroben Bedingungen besonders ausgeprägt (Chatterjee et al. 1975; Olive und McCalla 1975; Olive und McCalla 1977).

Bei Lymphozyten des Menschen und Knochenmarkszellen der Ratte führen Nitrofurane zu Chromosomenaberrationen und Chromosomenbrüchen (Klemencic und Wang 1978; McCalla 1979; Sugiyama et al. 1975; Tonomura und Sasaki 1973; Vig et al. 1976).

Furylfuramid bewirkt bei diploiden Zellen des Menschen eine mutationsbedingte Steigerung der Widerstandskraft gegen 8-Azaguanin, bei Zellen von Hamsterembryonen zusätzlich eine Verminderung der Empfindlichkeit gegen 6-Thioguanin (Inui et al. 1976; Kuroda 1975).

2.6.4 Kanzerogenität

Der erste Nachweis von kanzerogenen Eigenschaften der Nitrofurane gelang Stein 1966. Als besonders effektiv in der Erzeugung von benignen und malignen Tumoren erwiesen sich Nitrofurane mit einem Thiazolrest am C₂ des Furan-ringes (Stein et al. 1966). Die einzelnen Verbindungen dieser Gruppe besitzen eine deutliche Organspezifität, die jedoch tierartliche Unterschiede aufweist.

FNT verursacht bei Ratten Tumoren der Milchdrüse, der Nieren, des äußeren Gehörgangs und des Darmtraktes. Auch Tumoren der Leber können durch FNT erzeugt werden. Jedoch werden bei Ratten häufig nur Gesaugetumoren beobachtet, da die Tiere daran sterben, bevor sich andere Neoplasmen entwickeln können. Bei Mäusen werden in erster Linie Magentumoren, aber auch Leukämie und Geschwülste im Lungengewebe und in der Milchdrüse verursacht (Cohen et al. 1973; Ertürk et al. 1970). Beim Goldhamster führt FNT zur Bildung von Magentumoren, Übergangszelltumoren der Blase und Neoplasmen der Nebenniere. Das Meerschweinchen ist für die kanzerogenen Eigenschaften von Nitrofuranen nicht empfänglich (Cohen 1978). Möglicherweise liegt die Ursache hierfür in der Darmflora der Meerschweinchen begründet. Meerschweinchen haben im Gegensatz zu den anderen aufgeführten Versuchstieren eine grampositive Darmflora. Dies könnte zu anderen Metaboliten mit anderen Resorptionseigenschaften führen, als bei einer Besiedelung des Darmes mit grampositiven Bakterien (Schmid 1984).

Der Wirkstoff FANFT erzeugt bei Maus, Ratte und Gold-

hamster Blasentumoren (Ertürk et al. 1967; Ibrahiem et al. 1983). Weiterhin kommen mit tierartlich unterschiedlicher Verteilung Neoplasmen des Nierenbeckens und des Gesäuges vor. Bei der Maus verursacht FANFT auch Lungentumoren und lymphozytäre Leukämie (Cohen 1978). Die Blasentumorinduktion durch FANFT wird mit Allopurinol verstärkt (Wang et al. 1976).

Lymphozytäre Leukämie wird bei der Maus sehr spezifisch durch NFTA hervorgerufen. Die Entstehung einer Leukämie wird durch vorherige Thymektomie unterbunden (Cohen et al. 1970). Bei Ratte, Hamster und Hund werden wiederum mit tierartlich unterschiedlicher Verteilung Tumoren des Gesäuges, der Lunge, der Blase, der Speicheldrüsen und der Gallenblase beobachtet (Cohen 1978).

Die Kanzerogenität des Konservierungsmittels AF-2 hat Ikeda 1974 entdeckt. Dieses Nitrofurantoin-Derivat erzeugt bei der Ratte vor allem Gesäugetumoren, aber auch Neoplasmen im Magen. Bei Maus und Hamster werden Magentumoren und Lungenadenome beobachtet. Zusätzlich treten beim Hamster Oesophagustumoren und Gallengangsadenome auf (Cohen 1978; Nomura 1975).

Nifurprazin verursacht in höherer Dosierung bei kontinuierlicher Substanzgabe an Ratten Darmtumoren (Anonym 1976).

Auch verschiedene andere 5-Nitrofurantoin-Derivate zeigen unterschiedlich starke kanzerogene Eigenschaften. Bei Nitrofurantoin ergaben sich bisher keine Hinweise für eine Kanzerogenität (Cohen 1978; Morris et al. 1969; Price et al. 1966; Stein et al. 1966).

Für die kanzerogene Wirkung von Nitrofurantoinen ist die NO_2 -Gruppe notwendig. Strukturanaloga ohne Nitrogruppe sind nicht in der Lage, Tumoren zu erzeugen. Die Ursache für die Teratogenität, Mutagenität und Kanzerogenität bilden wahrscheinlich die Intermediärprodukte der Reduktion: Das Nitrofurantoinradikal, die Nitrosogruppe und das Hydroxylamin stehen im Verdacht, die genannten Wirkungen durch Schädigung der DNA zu verursachen (Cohen 1978).

III Eigene Untersuchungen

1 Vorbemerkung

Gegenstand der eigenen Untersuchungen ist die vergleichende metabolische Radikalbildung von Nitrofurantoin und Nifurpazin in vivo (s. I Einleitung).

Von diesen Nitrofuranderivaten ist Nitrofurantoin ein Azomethinderivat, das nicht kanzerogen sein soll; Nifurpazin ist ein kanzerogenes Vinylderivat.

Die Untersuchungen sind mit Mäusen durchgeführt worden, weil diese Tierart eine hohe Stoffwechselaktivität aufweist und deshalb für metabolische Untersuchungen besonders geeignet erscheint.

Als Indikatoren der Radikalbildung sind die Expiration von Ethan und Ethen sowie die Malondialdehydbildung in der Leber bestimmt worden. Es handelt sich dabei um Folgeprodukte radikalinduzierter Lipidperoxide von zellularen und subzellulären Membranen.

Eine endogene Bildung von Radikalen ist bei der metabolischen Reduktion der NO_2 -Gruppe der Nitrofuranderivate zu erwarten. Sie wird von "Nitroreduktasen" - vor allem von der mikrosomalen NADPH-Cytochrom c-Reduktase (Cytochrom P 450-Reduktase) und der cytosolischen Xanthinoxidase - bewerkstelligt. Dabei entstehen im ersten Reduktionsschritt Nitroanionenradikale:



die in vivo, d. h. in Gegenwart von Sauerstoff, rasch zu Superoxidradikalen und der Ausgangsverbindung umgesetzt werden:



Ob unter diesen Umständen eine weitergehende Reduktion des

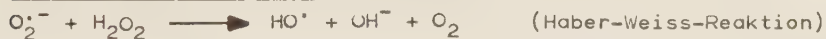
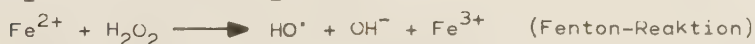
Nitroanionenradikals zu anderen radikalischen Intermediaten ablaufen kann, ist offen.

Die entstehenden Superoxidradikale sind an sich von relativ geringer toxikologischer Bedeutung, da sie von Superoxid-dismutasen (SOD) zu Sauerstoff und Peroxid disproportioniert und damit inaktiviert werden:

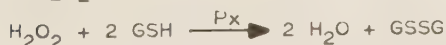


Sie sind anhand der o. e. Radikalindikatoren deshalb nicht ohne weiteres nachweisbar.

In Gegenwart von Redoxmetallen wie Eisen, Kupfer oder Mangan, können Superoxidradikale jedoch zu hochreaktiven Hydroxylradikalen umgesetzt und als solche nachgewiesen werden (katalysierte HABER-WEISS-Reaktion):



Die vorstehenden Umsatzgleichungen zeigen, daß an der Bildung der nachweisbaren Hydroxylradikale Wasserstoffperoxid beteiligt ist, das physiologischerweise durch Katalasen (Kat) und GSH-Peroxidasen (Px) inaktiviert wird:



Infolgedessen wird die Bildung von Hydroxylradikalen in vivo u. a. auch von der Aktivität dieser beiden Enzyme und von der aktuellen GSH-Konzentration abhängig sein.

2 Versuchsplan

Aufgrund der vorstehenden Überlegungen sind folgende experimentelle Untersuchungen durchgeführt worden:

- a) Beeinflussung der Radikalbildung von Nitrofurantoin und Nifurprazin durch den Sauerstoffpartialdruck im Atemgas der Versuchstiere ($PO_2 = 15, 20$ und $100 \text{ Vol\%}$).
- b) Beeinflussung der Radikalbildung von Nitrofurantoin und Nifurprazin durch eine Induktion der NADPH-Cytochrom c-Reduktase mit Phenobarbital und eine Hemmung mit Piperonylbutoxid.
- c) Beeinflussung der Radikalbildung von Nitrofurantoin und Nifurprazin durch eine Induktion der Xanthinoxidase mit Xanthin und eine Hemmung mit Allopurinol.
- d) Beeinflussung der Radikalbildung von Nitrofurantoin und Nifurprazin durch Fe^{2+} und Fe^{3+} .
- e) Beeinflussung der Radikalbildung von Nitrofurantoin und Nifurprazin durch eine Erniedrigung der endogenen GSH-Konzentration mit Diethylmaleinat (DEM).
- f) Beeinflussung der Radikalbildung von Nitrofurantoin und Nifurprazin durch eine Erniedrigung der endogenen GSH-Konzentration mit DEM und gleichzeitige Hemmung der Katalasen mit Aminotriazol.

Dazu sind Blindversuche ohne Versuchstiere und Kontrollversuche mit Versuchstieren durchgeführt worden.

3 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden konventionell gehaltene, männliche Mäuse aus eigener Zucht des Instituts herangezogen. Das Durchschnittsgewicht der Tiere betrug 35 g.

Die Fütterung erfolgte ad libitum mit einer Haltdiät der Firma ALMA, Kempten und aqua font. Das Futter hatte nach Herstellerangaben folgende Zusammensetzung:

Umsetzbare Energie	11360 Joule/kg
--------------------	----------------

Zusammensetzung	(Masse% in der Diät)
-----------------	----------------------

Mais	32,0
Weizen	20,0
Sojaschrot, extr.	18,0
Maisarin	10,0
Luzernegrüngrasmehl	6,0
Fischmehl	3,0
Melasse	3,0
Dorschmehl	2,0
Mineralstoffmischung	2,0
Vitamin-Vormischung	2,0
Magermilchpulver	1,0
Futterfett	1,0

Rohnährstoffe	(Masse% in der Diät)
---------------	----------------------

Rohprotein	20,0
Rohasche	7,0
Rohfaser	5,0
Rohfett	4,0

Mineralstoffe	(g/kg Diät)
---------------	-------------

Calcium	10,0
Phosphor	7,4
Natrium	5,1
Magnesium	2,4
Kalium	9,3

Spurenelemente	(mg/kg Diät)
----------------	--------------

Eisen	50,0
Mangan	50,0
Zink	12,0
Kupfer	5,0
Jod	0,2

Vitaminzusätze	(mg/kg Diät, wenn nicht anders angegeben)
Vit. A	15000 I.E./kg
Vit. D ₃	500 I.E./kg
Vit. E	150
Vit. K ₃	10
Vit. B ₁	10
Vit. B ₂	20
Vit. B ₆	15
Vit. B ₁₂	30 mcg/kg
Ca-D-Pantothenat	50
Nicotinsäure	50
Cholin	1000
Folsäure	5
Biotin	60 mcg/kg
Vit. C	50

Aminosäuren	(g/100 g Rohprotein)
Lysin	6,1
Lysin, verfügbar	2,8
Methionin + Cystein	4,2 (50 % Methionin)
Phenylalanin + Tyrosin	9,0 (60 % Phenylalanin)
Arginin	6,8
Histidin	2,4
Tryptophan	1,3
Threonin	4,0
Isoleucin	4,7
Leucin	9,4
Valin	5,2

4 Untersuchungsmethode

4.1 Chemikalien, Lösungen und Gase

Folgende Chemikalien, Lösungen und Gase wurden bei den Untersuchungen verwendet:

- Nitrofurantoin, von der Firma RÖHM PHARMA GmbH, Weiterstadt freundlicherweise überlassen

- Nifurprazin, als Nifurprazinhydrochlorid, von der Firma
PRAEMIX WIRKSTOFF GmbH, Mannheim freundlicherweise
überlassen
- Paraffin flüssig
MERCK, Darmstadt
- Ethan (C_2H_6), Ethen (C_2H_4) als Prüfgas
LINDE, Unterschleißheim
- Sauerstoff (O_2), 99,995 Vol%
Stickstoff (N_2), 99,9995 Vol%
Wasserstoff (H_2), 99,999 Vol%
Synthetische Luft (20 Vol% O_2 und 80 Vol% N_2)
Kohlenwasserstoffanteil < 5 vpm
LINDE, Unterschleißheim
- Atemkalk, Dräger-Sorb 800 Absorptionskalk, vor Versuchs-
beginn 1 h lang bei $100^\circ C$ getrocknet
DRÄGERWERK AG, Lübeck
- Malondialdehyd-bis-(diethylacetal) ($C_{11}H_{24}O_4$)
zur Synthese
MERCK-SCHUCHARDT, Hohenbrunn bei München
- Trichloressigsäure (CCl_3COOH) zur Analyse,
MERCK, Darmstadt
- n-Hexan (C_6H_{14}) reinst,
MERCK, Darmstadt
- 2-Thiobarbitursäure ($C_4H_4N_2O_2S \cdot H_2O$), Reagenz auf
Sorbinsäure
MERCK, Darmstadt
- Natriumdihydrogenphosphat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)
MERCK, Darmstadt
- di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)
zur Analyse
MERCK, Darmstadt
- Glutathion, oxidierte Form, Gehalt 99 %
SIGMA Chemie GmbH, München
- Glutathion Reduktase
SIGMA Chemie GmbH, München

- 5,5-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure), (DTNB)
SIGMA Chemie GmbH, München
- β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduzierte Form (NADPH), Gehalt 98-99 %
SIGMA Chemie GmbH, München
- di-Natrium-Edetat (Titriplex III) ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$) zur Analyse
MERCK, Darmstadt
- Xanthin (2,6-Dioxopurin), Gehalt 99-100 %
SIGMA Chemie GmbH, München
- Allopurinol (4-Hydroxypyrazolo-(3,4-d)pyrimidin)
SIGMA Chemie GmbH, München
- Piperonylbutoxid ($C_{19}H_{30}O_5$), Gehalt 99 %
SERVA FEINBIOCHEMICA, Heidelberg
- Phenobarbital als Luminal^(R)
BAYER, Leverkusen/MERCK, Darmstadt
- Eisen(III)-hydroxid-Dextran-Komplex als Myofer^(R)
HOECHST VETERINAR GmbH, Unterschleißheim
- Eisen(II)-sulfat ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) zur Analyse
MERCK, Darmstadt
- 3-Amino-1,2,4-triazol
SIGMA Chemie GmbH, München
- Diethylmaleinat ($C_2H_5OOCCH=CHCOOC_2H_5$), Gehalt 93 %
MERCK-SCHUCHARDT, Hohenbrunn bei München
- Phosphatpuffer: 252 mg $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 1900 mg $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 234,5 mg Titriplex III, aqua bidest. ad 100 ml; pH 7,4
- NADPH-Lösung: 30 mg NADPH, Phosphatpuffer ad 100 ml
- DTNB-Lösung: 140 mg DTNB, Phosphatpuffer ad 100 ml
- GSH-Reduktase-Lösung: 100 units (0,53 ml) plus 1,33 ml Phosphatpuffer

4.2 Versuchsablauf

Den Versuchstieren wurde in Paraffin suspendiertes Nitrofurantoin oder Nifurprazin (Testsubstanz) intraperitoneal (ip) verabreicht. Dabei ist ein Applikationsvolumen von 10 ml/kg Körpermasse eingehalten worden. Danach wurden je 4 Tiere in einen kleinen Exsikkator auf ein Drahtgitter gesetzt. Unter dem Drahtgitter befanden sich 100 g getrockneter Atemkalk zur Absorption des expirierten Kohlendioxids. Der Exsikkator wurde bei Versuchsbeginn mit synthetischer Luft gespült und an eine drucklose Sauerstoffversorgung angeschlossen. Nach 120 Minuten erfolgte die Bestimmung der Ethan- und Ethenkonzentration im Exsikkatorgas und die Ermittlung der Malondialdehydkonzentration in der Mäuseleber.

Die Glutathionbestimmung erfolgte 30 Minuten nach Verabreichung der Testsubstanzen.

4.3 Kohlenwasserstoffnachweis

Zum Nachweis von Ethan und Ethen wurden mit einer Spritze 10 ml der Exsikkatorluft durch ein Silikongummiseptum entnommen und in einen Gaschromatographen der Firma Carlo Erba (Fractovap 4100) eingegeben. 3 ml der Gasprobe kamen dabei zur Analyse. Als Trennsäule diente eine 5 m lange Stahlsäule mit 3 mm Innendurchmesser und einer Füllung von 2 % Carbowax 20 M auf Porasil C der Korngröße 80-100 mesh. Der Gasnachweis erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor, der mit Wasserstoff und synthetischer Luft betrieben wurde. Die Arbeitstemperatur der Säule betrug 50 °C, die des Detektors 120 °C. Als Trugergas diente nachgereinigter Stickstoff mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 30 ml/min. Zur Auswertung wurde die Höhe der durch Ethan und Ethen verursachten Peaks im Chromatogramm herangezogen.

4.4 Malondialdehyd (MDA)-Nachweis

Zum Nachweis von Malondialdehyd (Ottolenghi 1959) wurden die Tiere nach der Exposition im Exsikkator mit Stickstoff betäubt, dekapitiert und entblutet. Danach

wurde den Tieren ein Teil der Leber entnommen, dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gespült und an Filterpapier getrocknet. Darauf erfolgte eine Homogenisierung des Lebergewebes mit der gleichen Menge physiologischer Kochsalzlösung 30 Sekunden lang bei 15000 upm (Ultra Turrax). 1 ml des Homogenats wurde mit 3 ml 5 %iger Trichloressigsäure vermischt und 10 Minuten mit einer Laborzentrifuge bei 6000 upm zentrifugiert. Dann erfolgte das Ausschütteln von 2 ml des Überstandes mit 2 ml n-Hexan. Nach zehnminütigem Zentrifugieren bei 6000 upm wurde 1 ml der klaren, unteren Phase mit 2 ml 70 %iger Trichloressigsäurelösung und mit 2 ml 0,8 %iger Thiobarbitursäurelösung versetzt und 30 Minuten im Wasserbad bei 95 °C unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurden die Proben abgekühlt und die Extinktion bei 535 nm und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen.

4.5 Glutathionbestimmung

Für die Glutathionbestimmung (Ellman 1959) wurden die Tiere betäubt, dekapitiert und entblutet. Die Behandlung der Leberproben erfolgte bis zum Ausschütteln mit n-Hexan und nachfolgendem Zentrifugieren in gleicher Weise wie beim Malondialdehydnachweis. Bei der Glutathionbestimmung kamen von der so erhaltenen klaren, unteren Phase 0,01 ml zur weiteren Verwendung. Diese Menge wurde mit 5 ml Phosphatpuffer vermischt. 0,5 ml dieser verdünnten löslichen Leberfraktion wurden darauf mit 2 ml NADPH-Lösung und mit 0,5 ml DTNB-Lösung versetzt und 10 Minuten bei 30 °C gehalten. Für die Vergleichslösung kamen die gleichen Mengen der NADPH- und DTNB-Lösung und statt der verdünnten Leberfraktion 0,5 ml Phosphatpuffer zur Verwendung. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zusatz von 0,02 ml einer GSH-Reduktase-Lösung in beide Ansätze. Danach wurde bei 412 nm die Extinktion 15 Minuten lang minütlich abgelesen. Der Extinktionszuwachs pro Minute ist proportional zur Glutathionkonzentration.

Der Glutathiongehalt in der Leber unterliegt relativ großen tageszeitlichen Schwankungen. Deshalb wurden die Testwerte der Versuchstiere mit Nitrofurantoin- bzw. Nifurprazinbelastung auf simultan ermittelte Kontrollwerte von Versuchstieren mit Paraffinbelastung (im Mittel $6,01 \pm 0,38 \mu\text{mol pro Gramm Leber}$) bezogen.

4.6 Einstellung des Sauerstoffpartialdruckes

Zur Herstellung eines 15 %igen Sauerstoffanteiles in der Exsikkatorluft wurde ein Gasbehälter mit Stickstoff gespült. Dann erfolgte die Zugabe von 15 % Sauerstoff unter Stickstoffverdrängung. Mit diesem Gasgemisch sind dann die Exsikkatoren gespült worden.

Ein 100 %iger Sauerstoffanteil in der Exsikkatorluft konnte durch Spülung der Exsikkatoren mit reinem Sauerstoff erreicht werden.

4.7 Induktion und Hemmung der NADPH-Cytochrom c-Reduktase

Die Induktion der NADPH-Cytochrom c-Reduktase erfolgte mit Phenobarbital (Thurman et al. 1980) in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpermasse. Phenobarbital wurde hierfür in aqua dest. gelöst und an 3 Tagen vor dem Versuch ip verabreicht.

Die Hemmung der NADPH-Cytochrom c-Reduktase erfolgte mit Piperonylbutoxid (Graham et al. 1970) in einer Dosierung von 400 mg/kg Körpermasse 1 Stunde vor Versuchsbeginn. Piperonylbutoxid wurde zu diesem Zweck mit Paraffin verdünnt und ip appliziert.

4.8 Induktion und Hemmung der Xanthinoxidase

Zur Induktion der Xanthinoxidase wurden die Tiere an 3 Tagen vor dem Versuch mit Xanthin vorbehandelt. Die Dosis betrug 200 mg/kg Körpermasse. Das Xanthin wurde in Paraffin suspendiert und ip verabreicht.

Die Hemmung der Xanthinoxidase erfolgte durch ip Applikation von Allopurinol in physiologischer Kochsalzlösung 1 Stunde vor Versuchsbeginn. Die Dosierung des Allopurinols betrug dabei 200 mg/kg Körpermasse.

4.9 Vorbehandlung mit Eisenionen

Die Vorbehandlung mit Eisen(II)-Ionen erfolgte subcutan (sc) 30 Minuten vor Versuchsbeginn in einer Dosierung von 0,2 mmol/kg Körpermasse.

Die Vorbehandlung mit Eisen(III)-Ionen wurde 1 Stunde vor Versuchsbeginn ebenfalls durch sc Injektion durchgeführt. Die Dosierung betrug 26,9 mmol/kg Körpermasse.

4.10 Senkung des Glutathionspiegels

Die Senkung des Glutathionspiegels erfolgte durch Diethylmaleinat (DEM) (Högberg et al. 1975; Jaeger et al. 1974). Der Wirkstoff wurde hierfür in Paraffin emulgiert und in einer Dosierung von 4 mmol/kg Körpermasse 2 Stunden vor Versuchsbeginn ip appliziert.

4.11 Erhöhung des H_2O_2 -Spiegels

Die Erhöhung des H_2O_2 -Spiegels wurde durch kombinierte Verabreichung von DEM zur Glutathionverarmung und von Aminotriazol zur Hemmung der Katalase angestrebt. DEM wurde dabei 2 Stunden vor Versuchsbeginn in einer Dosierung von 4 mmol/kg Körpermasse sc appliziert. Die Verabreichung von Aminotriazol erfolgte oral 30 Minuten vor Versuchsbeginn in einer Dosierung von 2 g/kg Körpermasse.

5 Versuchsauswertung

5.1 Kohlenwasserstoffberechnung

5.1.1 Qualitative Bestimmung

Die Identifikation der flüchtigen Kohlenwasserstoffe Ethan und Ethen im Chromatogramm erfolgte mit Hilfe von Referenzgasen und anhand ihrer Retentionszeiten.

5.1.2 Quantitative Bestimmung

Für die Bestimmung der Konzentration von Ethan und Ethen im Exsikkatorgas wurde die Höhe der von diesen Gasen im Chromatogramm erzeugten Peaks herangezogen. Zwischen der Peakhöhe und der Gaskonzentration ergab sich bei der Erstellung einer Eichkurve folgender linearer Zusammenhang:

$$H = a + bC \quad (\text{cm})$$

mit a, b: substratspezifische Konstanten

H: Peakhöhe (cm)

C: Gaskonzentration ($\mu\text{l/l}$)

Aus den Meßwerten für die Eichkurven wurden die Parameter der Regressionsgeraden, die Korrelationskoeffizienten (r) sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) der Korrelationskoeffizienten ermittelt.

Tab. 5: Parameter der Eichkurven für Ethan und Ethen

Substanz	a	b	r	p<
Ethan	0,171	91,514	0,999	0,001
Ethen	0,362	84,086	0,999	0,001

In den Abbildungen 5 und 6 sind die Eichkurven graphisch dargestellt.

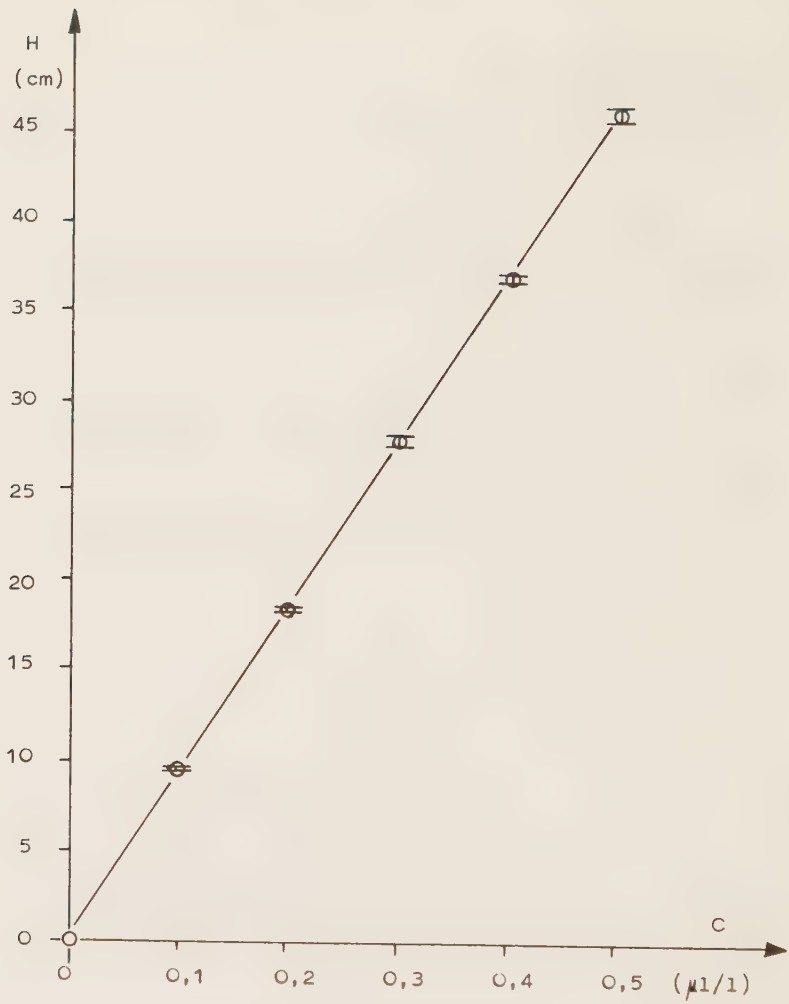


Abb. 5: Eichkurve für Ethanol ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

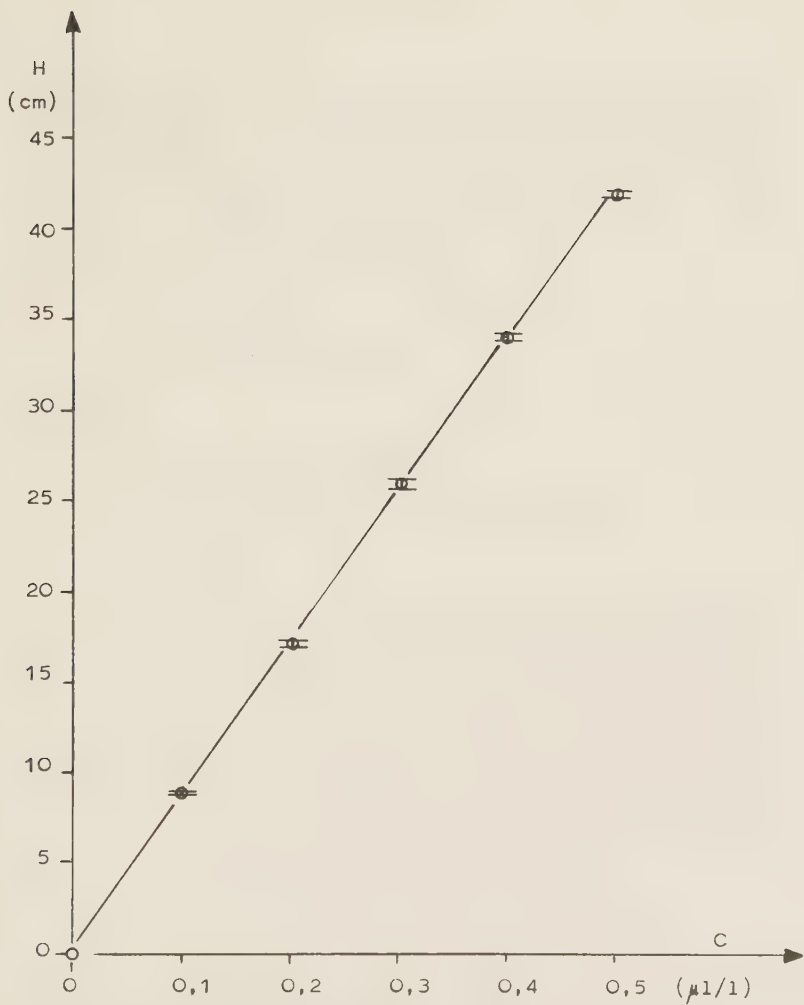


Abb. 6: Eichkurve für Ethen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Unter Verwendung des in den Eichkurven dargestellten Zusammenhangs zwischen Peakhöhe und Kohlenwasserstoffkonzentration ist die in den Exsikkatoren angereicherte Ethan- und Ethenmenge pro kg Versuchstier nach folgender Formel berechnet worden (Schmid 1984):

$$M = \frac{44,64 \cdot (H - a) \cdot V}{b \cdot TM} \quad (\text{nmol/kg} \cdot t)$$

mit M: Kohlenwasserstoffmenge (nmol/kg·t)

H: Peakhöhe (cm)

a,b: Eichkurvenparameter

V: Nettovolumen des Exsikkators (ml)

TM: Masse der Versuchstiergruppe (g)

t: Versuchsdauer (min)

5.2 Malondialdehydberechnung

Zur Erfassung der Malondialdehydkonzentration in der Leber wurde ebenfalls eine Eichkurve erstellt. Als Eichsubstanz ist Malondialdehyd-bis-(diethylacetal) verwendet worden. Aus der Verdünnungsreihe und der ermittelten Extinktion bei 535 nm ergab sich folgender linearer Zusammenhang:

$$E_{535} = a + bC$$

mit E_{535} : Extinktion bei 535 nm

a,b: Regressionskoeffizienten

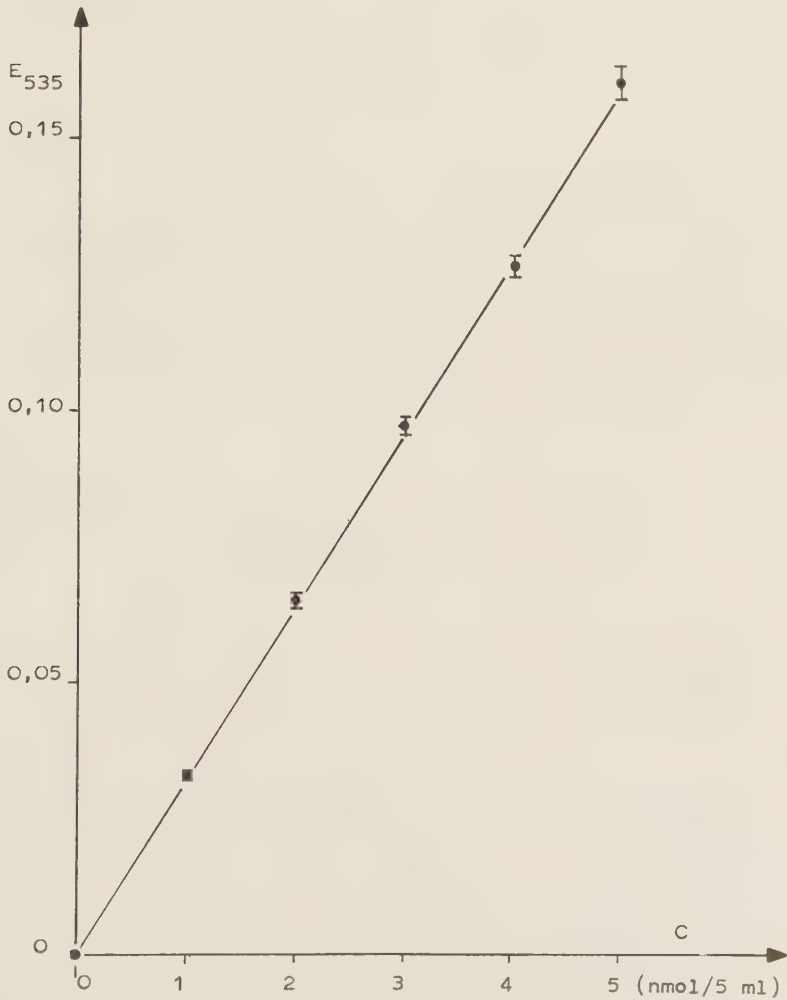
C: Malondialdehydkonzentration
(nmol/5 ml)

Aus den Meßwerten der Eichkurve wurden die Parameter der Regressionsgeraden, der Korrelationskoeffizient (r) sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) des Korrelationskoeffizienten ermittelt. Diese Daten sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tab. 6: Eichkurvenparameter für Malondialdehyd

a	b	r	p <
$8,21 \cdot 10^{-4}$	$3,197 \cdot 10^{-2}$	0,999	0,001

Die Eichkurve für Malondialdehyd ist in Abbildung 7 graphisch dargestellt.

Abb. 7: Eichkurve für Malondialdehyd ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Die Konzentration von Malondialdehyd in der Leber wurde mit Hilfe der Extinktion und den Parametern der Regressionsgeraden nach folgender Formel berechnet (Beuter 1984):

$$M = \frac{8 \cdot (E - a)}{b} \quad (\text{nmol/g})$$

mit M: Malondialdehydkonzentration in der Leber (nmol/g)

E: Extinktion bei 535 nm

a, b: Regressionskoeffizienten

5.3 Glutathionbestimmung

Für die Bestimmung der Glutathionkonzentration in der Leber wurde eine Eichkurve aus einer Verdünnungsreihe von oxidiertem Glutathion (GSSG) ermittelt. Der Zusammenhang zwischen der Konzentration und dem Extinktionszuwachs pro Minute läßt sich ebenfalls durch eine Geradengleichung beschreiben.

$$\Delta E = a + bC \quad (\text{min}^{-1})$$

mit ΔE : Extinktionszuwachs pro Minute bei 412 nm

a, b: Regressionskoeffizienten

C: GSSG-Konzentration im Ansatz (nmol/5 ml)

Die Parameter der Regressionsgeraden, der Korrelationskoeffizient (r) und dessen statistische Bewertung sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tab. 7: Eichkurvenparameter für die Glutathionbestimmung

a	b	r	p <
$-8,6 \cdot 10^{-5}$	$5,18 \cdot 10^{-3}$	0,998	0,001

Die Abbildung 8 gibt die Eichkurve für die Glutathionbestimmung wieder.

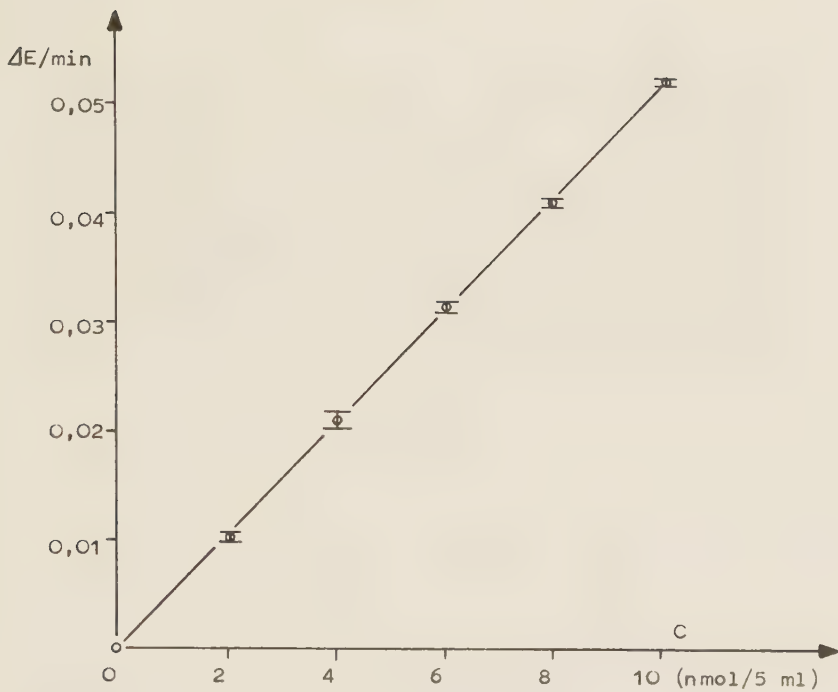


Abb. 8: Eichkurve für Glutathion ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Die Berechnung der Glutathionkonzentration in der Leber erfolgte nach folgender Formel (Beuter 1984):

$$M = \frac{800 \cdot 1,987 \cdot (\Delta E - a)}{b} \quad (\mu\text{mol/g})$$

mit M: GSH-Konzentration in der Leber ($\mu\text{mol/g}$)

ΔE : Extinktionsänderung pro Minute bei 412 nm

a, b: Regressionskoeffizienten

800: Verdünnungsfaktor

1,987: Umrechnungsfaktor von oxidiertem zu reduziertem Glutathion

5.4 Ergebnisbeurteilung

Bei den Dosis-Wirkungs-Kurven ohne Vorbehandlung wurde der Kontrollwert (Paraffinapplikation) mit den Testwerten (Nitrofuranapplikation) verglichen.

Bei den Dosis-Wirkungs-Kurven unter verändertem Sauerstoffpartialdruck in der Atemluft (15 Vol% bzw. 100 Vol%) oder nach Vorbehandlung ist der Kurvenverlauf mit den Ergebnissen unter Normalbedingungen ($PO_2 = 20$ Vol%) und ohne Vorbehandlung verglichen worden.

6 Ergebnisse

6.1 Blindversuche ohne Versuchstiere

6.1.1 Blindversuche mit synthetischer Luft

Die versuchsfertigen Exsikkatoren wurden mit synthetischer Luft gespült. Nach 120 Minuten ist eine Gasprobe in den Chromatographen eingegeben worden. Das dazugehörige Chromatogramm (Abb. 9) zeigt keine Kohlenwasserstoffe. Der Peak bei einer Retentionszeit von 2,85 Minuten ist unspezifisch und entsteht durch den eingegebenen Sauerstoff und Stickstoff (Einspritzpeak).

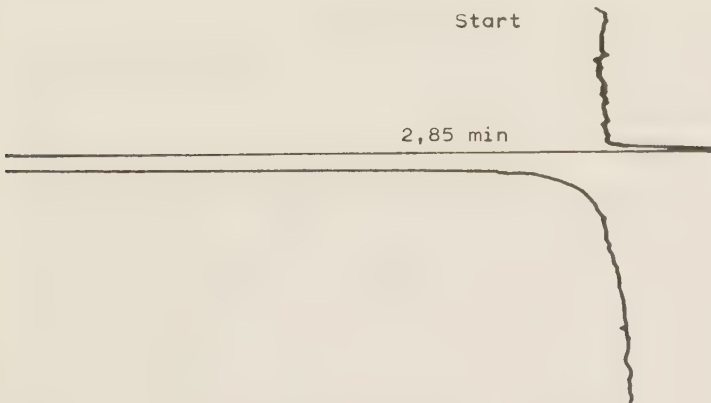


Abb. 9: Gaschromatogramm des Exsikkatorgases ohne Versuchstiere

6.1.2 Blindversuche mit Referenzgasen

Nach Eingabe eines Referenzgases, das aus synthetischer Luft mit Beimengung aus Ethan und Ethen bestand sind 2 Peaks nach 3,60 Minuten (Ethan) und nach 3,90 Minuten (Ethen) festgestellt worden (Abb. 10). Die Konzentration der Kohlenwasserstoffe betrug 0,05 $\mu\text{l/l}$.

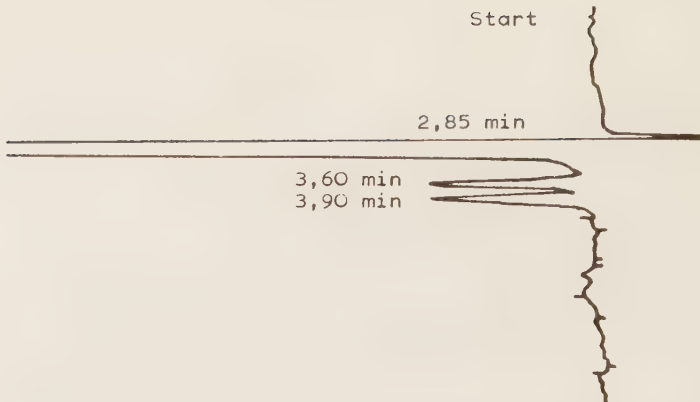


Abb. 10: Gaschromatogramm von synthetischer Luft mit
Zumischung von Ethan (3,60 min) und Ethen
(3,90 min)

6.2 Testversuche mit Nitrofurantoin

Im folgenden werden die Untersuchungsergebnisse nach intraperitonealer Verabreichung von Nitrofurantoin an die Versuchstiere beschrieben.

6.2.1 Versuche mit verschiedenem Sauerstoffpartialdruck

Dabei ist zunächst der normale Sauerstoffpartialdruck von 20 Vol% im Atemgas der Versuchstiere auf 15 Vol% erniedrigt und auf 100 Vol% erhöht worden. Die erhaltenen Befunde sind in den Tabellen 8, 9 und 10 angegeben.

Tab. 8: Kohlenwasserstoffexspiration, MDA-Bildung und
GSH-Gehalt der Leber bei einem PO_2 von 20 Vol%

Nitrofurantoin- dosis (mg/kg)	Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)	GSH (%)
0 mg/kg	4	4	4	
$\bar{x}$	1,75	2,00	5,97	
$s_{\bar{x}}$	0,20	0,14	0,79	
40 mg/kg	8	4	4	4
$\bar{x}$	1,92	1,67	6,75	102,2
$s_{\bar{x}}$	0,11	0,12	0,59	22,1

Fortsetzung Tab. 8:

Nitrofurantoin-dosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)	GSH (%)
80 mg/kg	n	4	4	4	4
	$\bar{x}$	3,87	2,49	8,05	84,9
	$s_{\bar{x}}$	0,18	0,23	0,28	9,2
120 mg/kg	n	4	4	4	4
	$\bar{x}$	3,78	2,21	5,06	78,5
	$s_{\bar{x}}$	0,22	0,14	0,25	9,7
160 mg/kg	n	4	4	4	4
	$\bar{x}$	5,34	2,45	7,14	65,9
	$s_{\bar{x}}$	0,14	0,21	0,72	12,1

MDA: Malondialdehyd; n: Stichprobenumfang; PO₂: Sauerstoffpartialdruck; $s_{\bar{x}}$: Standardabweichung des Mittelwertes; $\bar{x}$: arithmetischer Mittelwert

Tab. 9: Kohlenwasserstoffexpiration und MDA-Bildung in der Leber bei einem PO₂ von 15 Vol%

Nitrofurantoin-dosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,27	1,46	14,93
	$s_{\bar{x}}$	0,10	0,17	1,68
40 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,28	1,66	14,67
	$s_{\bar{x}}$	0,08	0,36	1,42
80 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,64	1,78	13,63
	$s_{\bar{x}}$	0,20	0,11	3,16

Fortsetzung Tab. 9:

Nitrofurantoin-dosis (mg/kg)	Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
120 mg/kg	4	4	4
$\bar{x}$	2,65	3,25	10,32
$s_{\bar{x}}$	0,17	0,54	1,43
160 mg/kg	4	4	4
$\bar{x}$	2,70	2,76	10,19
$s_{\bar{x}}$	0,28	0,50	1,90

Tab. 10: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Bildung in der Leber bei einem PO_2 von 100 Vol%

Nitrofurantoin-dosis (mg/kg)	Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	4	4	4
$\bar{x}$	1,35	1,55	12,75
$s_{\bar{x}}$	0,08	0,18	2,10
40 mg/kg	4	4	4
$\bar{x}$	1,66	1,49	13,61
$s_{\bar{x}}$	0,16	0,09	1,66
80 mg/kg	4	4	4
$\bar{x}$	2,53	1,81	15,65
$s_{\bar{x}}$	0,08	0,14	2,18
120 mg/kg	4	4	4
$\bar{x}$	3,69	2,11	11,68
$s_{\bar{x}}$	0,21	0,17	0,64
160 mg/kg	4	4	4
$\bar{x}$	3,84	2,44	12,07
$s_{\bar{x}}$	0,24	0,48	0,67

Die Ergebnisse der vorstehenden Tabellen 8, 9 und 10 sind in den folgenden Abbildungen 11, 12, 13 und 14 graphisch veranschaulicht.

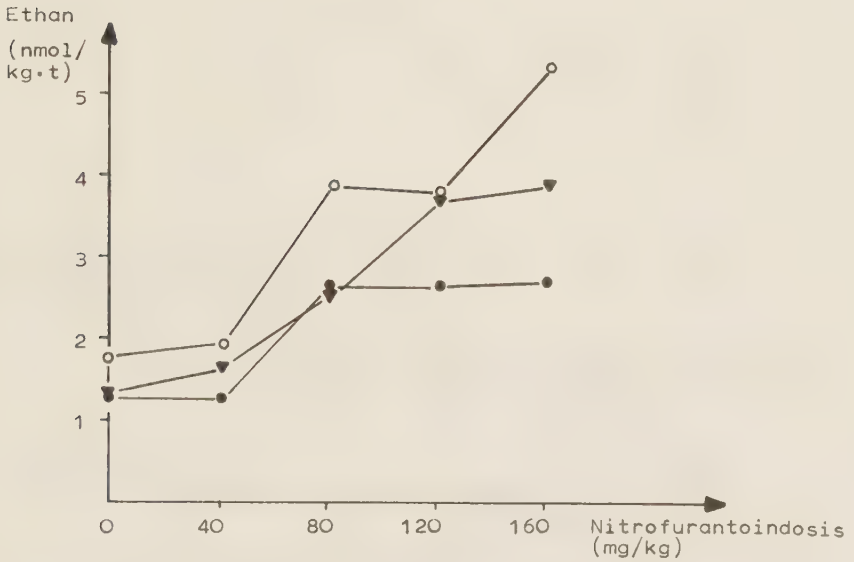


Abb. 11: Ethanexspiration als Funktion der Nitrofurantoin-dosis bei einem PO₂ von 15 (●), 20 (○) und 100 (▼) Vol%

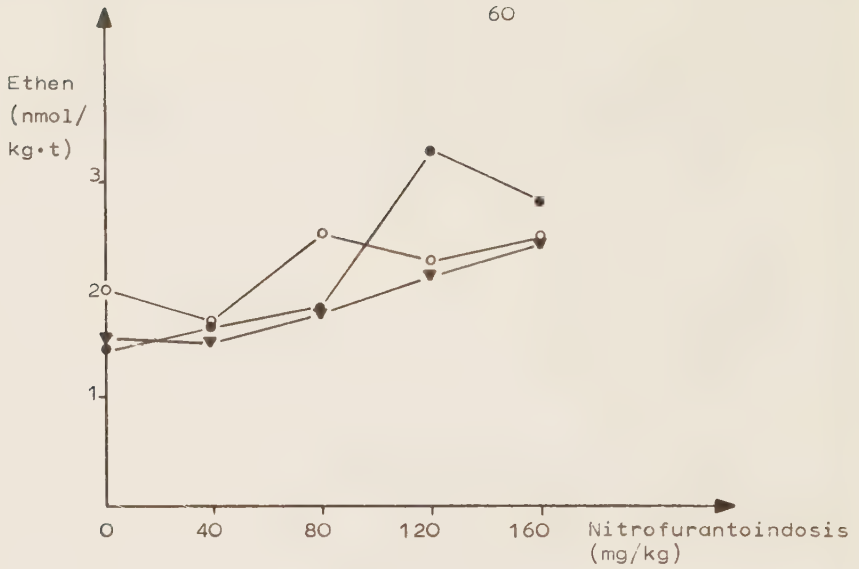


Abb. 12: Ethenexspiration als Funktion der Nitrofurantoin-dosis bei einem PO₂ von 15 (●), 20 (○) und 100 (▼) Vol%

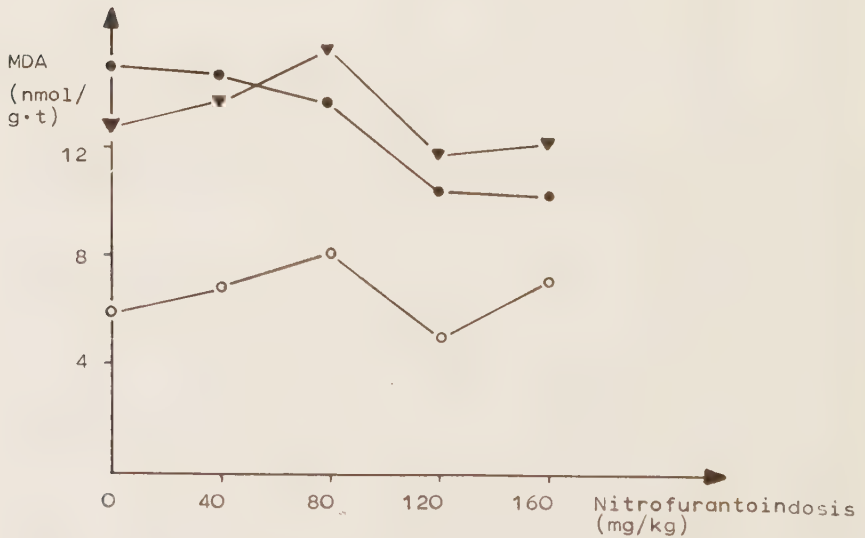


Abb. 13: MDA-Bildung in der Leber als Funktion der Nitrofurantoin-dosis bei einem PO₂ von 15 (●), 20 (○) und 100 (▼) Vol%

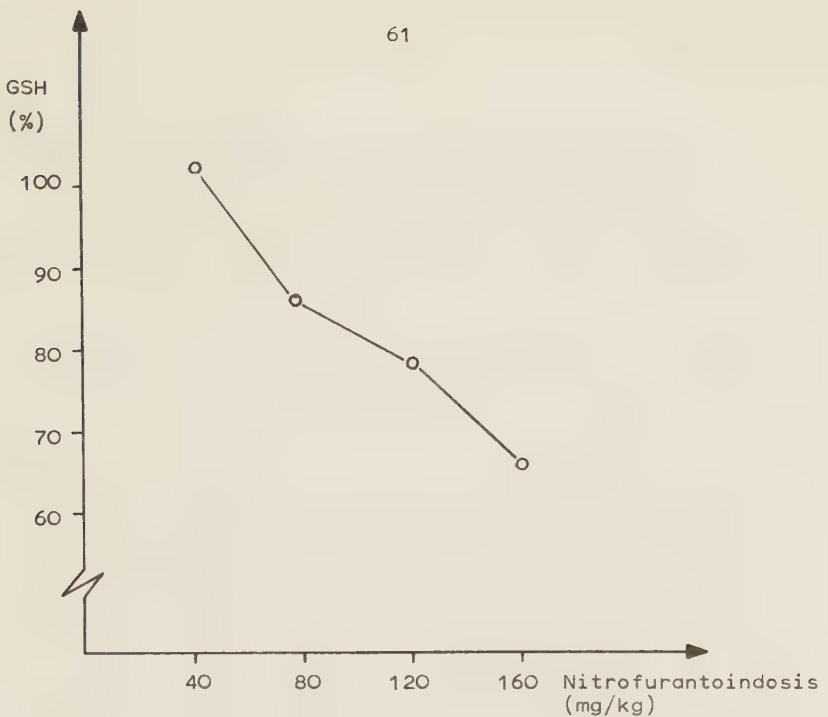


Abb. 14: GSH-Konzentration in der Leber als Funktion der Nitrofurantoindose bei einem PO_2 von 20 Vol%

Die Ergebnisse bei einem PO_2 von 20 Vol% zeigen einen deutlichen Anstieg der Ethanentwicklung nach Applikation von Nitrofurantoin. Die Ethanentwicklung und die MDA-Bildung in der Leber besitzt dagegen keine deutliche Abhängigkeit von der Nitrofurantoindose. Die GSH-Konzentration in der Leber wird nach Nitrofurantoinapplikation gesenkt.

Bei einer Verminderung des PO_2 verringert sich die Bildung von Ethan. Die MDA-Konzentration in der Leber erfährt unter diesen Bedingungen eine dosisabhängige Absenkung. Auch nach einer Verminderung des PO_2 ist bei der Ethanentwicklung und nach einer Erhöhung des PO_2 bei allen drei gemessenen Parametern keine Abhängigkeit von der Nitrofurantoindose erkennbar.

Alle folgenden Versuche mit Nitrofurantoin nach Vorbehandlung wurden bei einem PO_2 von 20 Vol% durchgeführt.

6.2.2 Versuche mit Phenobarbital- oder Piperonylbutoxid-vorbehandlung

Die Ergebnisse nach Vorbehandlung mit Phenobarbital oder Piperonylbutoxid sind in den Tabellen 11 und 12 aufgeführt.

Tab. 11: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Bildung in der Leber nach Vorbehandlung mit Phenobarbital in Abhängigkeit von der Nitrofurantoidosis

Nitrofurantoin-dosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,17	1,02	8,97
	$s_{\bar{x}}$	0,06	0,11	1,27
40 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,49	1,20	11,36
	$s_{\bar{x}}$	0,24	0,38	1,63
80 mg/kg	n	5	5	4
	$\bar{x}$	1,83	0,95	10,58
	$s_{\bar{x}}$	0,21	0,07	1,57
120 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,22	1,36	7,27
	$s_{\bar{x}}$	0,14	0,12	1,17
160 mg/kg	n	5	5	4
	$\bar{x}$	2,30	1,36	12,40
	$s_{\bar{x}}$	0,17	0,12	2,52

Tab. 12: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Bildung
in Abhängigkeit von der Nitrofurantoindosis
nach Vorbehandlung mit Piperonylbutoxid

Nitrofurantoin- dosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	n	8	8	8
	$\bar{x}$	2,20	1,26	9,61
	$s_{\bar{x}}$	0,31	0,10	0,70
40 mg/kg	n	8	8	8
	$\bar{x}$	2,61	1,59	10,03
	$s_{\bar{x}}$	0,23	0,18	0,78
80 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,90	2,06	9,29
	$s_{\bar{x}}$	0,31	0,36	1,08
120 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	3,25	2,07	10,39
	$s_{\bar{x}}$	0,23	0,04	1,97
160 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	3,33	1,92	10,97
	$s_{\bar{x}}$	0,57	0,23	0,83

Die Ergebnisse aus den Tabellen 11 und 12 sind in den Abbildungen 15, 16 und 17 graphisch dargestellt. Zum Vergleich sind auch die Dosis-Wirkungs-Kurven nach alleiniger Nitrofurantoinbehandlung aufgeführt.

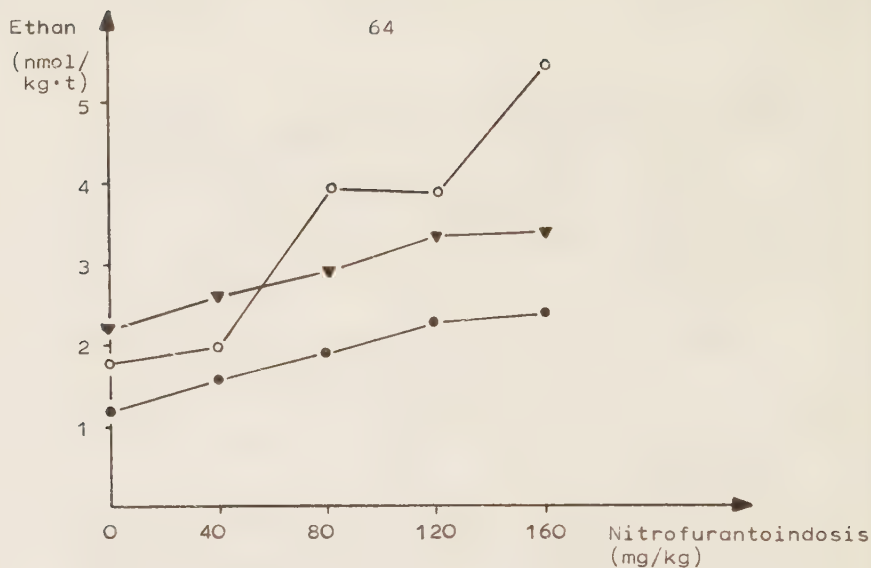


Abb. 15: Ethanexspiration in Abhängigkeit von der Nitrofurantoindosis ohne Beeinflussung (○), nach Piperonylbutoxid (▼) und nach Phenobarbital (●)

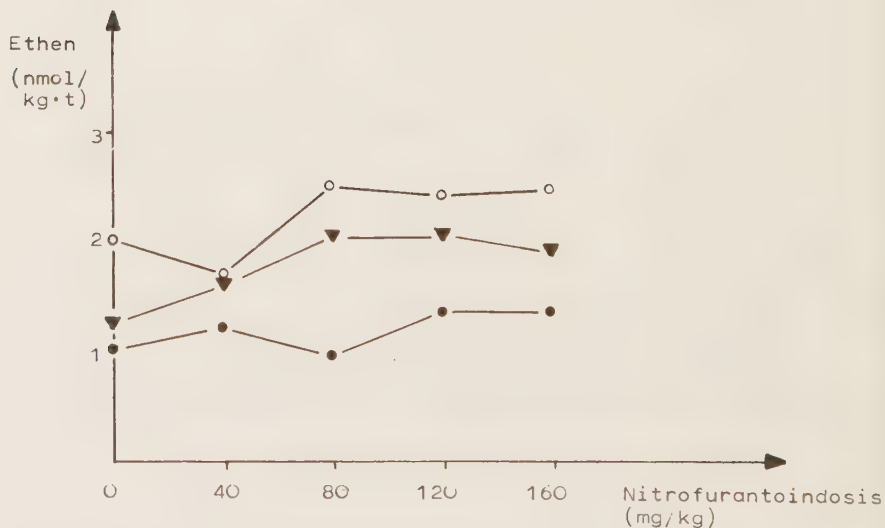


Abb. 16: Ethenexspiration in Abhängigkeit von der Nitrofurantoindosis ohne Beeinflussung (○), nach Piperonylbutoxid (▼) und nach Phenobarbital (●)

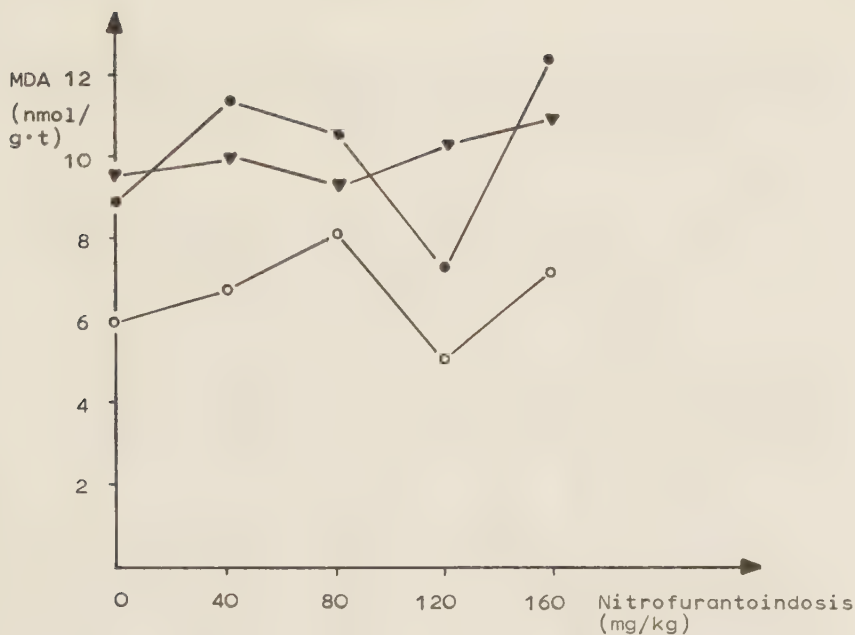


Abb. 17: MDA-Bildung in Abhängigkeit von der Nitrofurantoindosis ohne Beeinflussung (○), nach Piperonylbutoxid (▼) und nach Phenobarbital (●)

Die Vorbehandlung mit Phenobarbital bzw. mit Piperonylbutoxid verursacht im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Tieren eine verminderte Ethanexspiration.

Eine Abhängigkeit der Ethen- und MDA-Entwicklung von der Nitrofurantoindosis ist auch nach der Vorbehandlung mit Phenobarbital bzw. Piperonylbutoxid nicht deutlich erkennbar.

6.2.3 Versuche mit Xanthin- oder Allopurinolvorbehandlung

Die Versuchsergebnisse nach Vorbehandlung mit Xanthin oder Allopurinol sind in den Tabellen 13 und 14 aufgeführt.

Tab. 13: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Bildung in Abhängigkeit von der Nitrofurantoin-dosis nach Vorbehandlung mit Xanthin

Nitrofurantoin-dosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,37	1,22	8,76
	$s_{\bar{x}}$	0,15	0,03	1,72
40 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,53	1,20	8,83
	$s_{\bar{x}}$	0,05	0,13	1,84
80 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,61	1,58	7,98
	$s_{\bar{x}}$	0,06	0,20	1,72
120 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,82	1,67	7,40
	$s_{\bar{x}}$	0,14	0,19	1,46
160 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,68	2,32	9,67
	$s_{\bar{x}}$	0,15	0,24	1,21

Tab. 14: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Bildung
in Abhängigkeit von der Nitrofurantoinosis
nach Vorbehandlung mit Allopurinol

Nitrofurantoin- dosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	n	8	8	8
	$\bar{x}$	1,70	1,23	10,81
	$s_{\bar{x}}$	0,14	0,11	1,21
40 mg/kg	n	8	8	8
	$\bar{x}$	2,47	1,48	8,6
	$s_{\bar{x}}$	0,27	0,12	0,98
80 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	3,33	1,66	8,77
	$s_{\bar{x}}$	0,36	0,17	0,39
120 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	3,30	1,74	8,64
	$s_{\bar{x}}$	0,28	0,11	0,49
160 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	3,46	1,80	9,22
	$s_{\bar{x}}$	0,54	0,11	1,45

In den Abbildungen 18, 19 und 20 sind die Ergebnisse aus den Tabellen 13 und 14 graphisch veranschaulicht. Zum Vergleich ist wiederum die unbeeinflusste Dosis-Wirkungs-Kurve von Nitrofurantoin eingetragen.

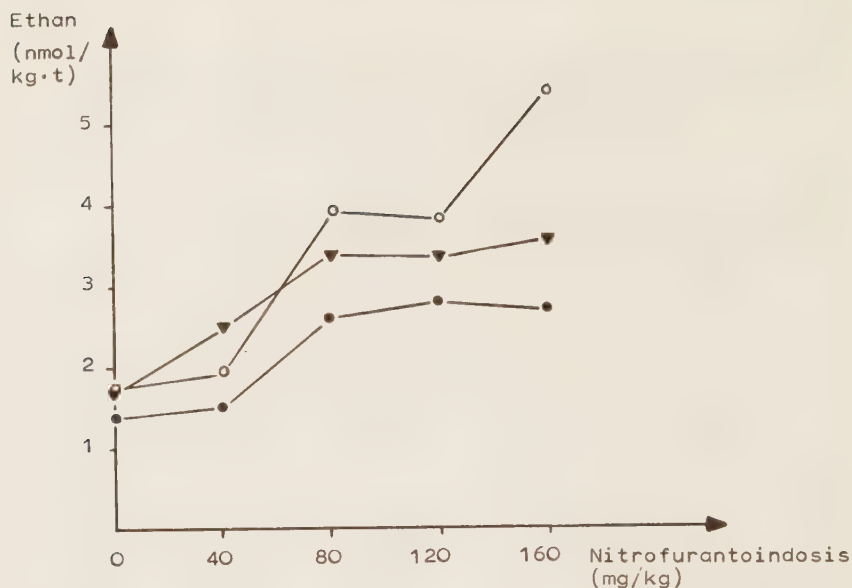


Abb. 18: Ethanexspiration in Abhängigkeit von der Nitrofurantoindosis ohne Beeinflussung (○), nach Xanthin (●) und nach Allopurinol (▼)

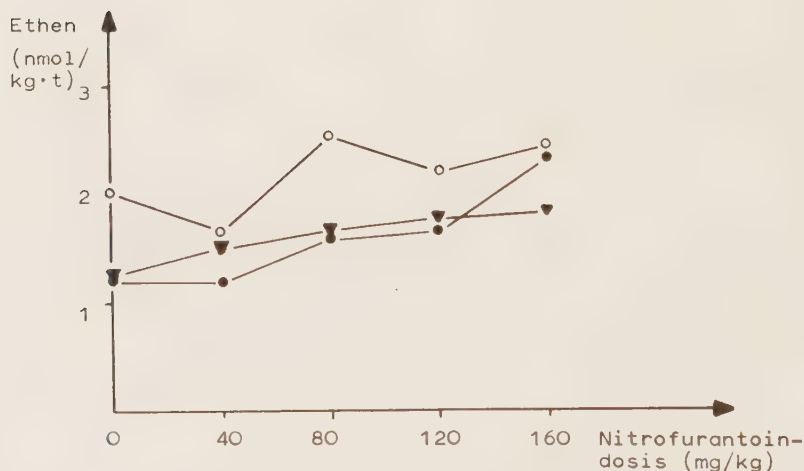


Abb. 19: Ethenexspiration in Abhängigkeit von der Nitrofurantoindosis ohne Beeinflussung (○), nach Xanthin (●) und nach Allopurinol (▼)

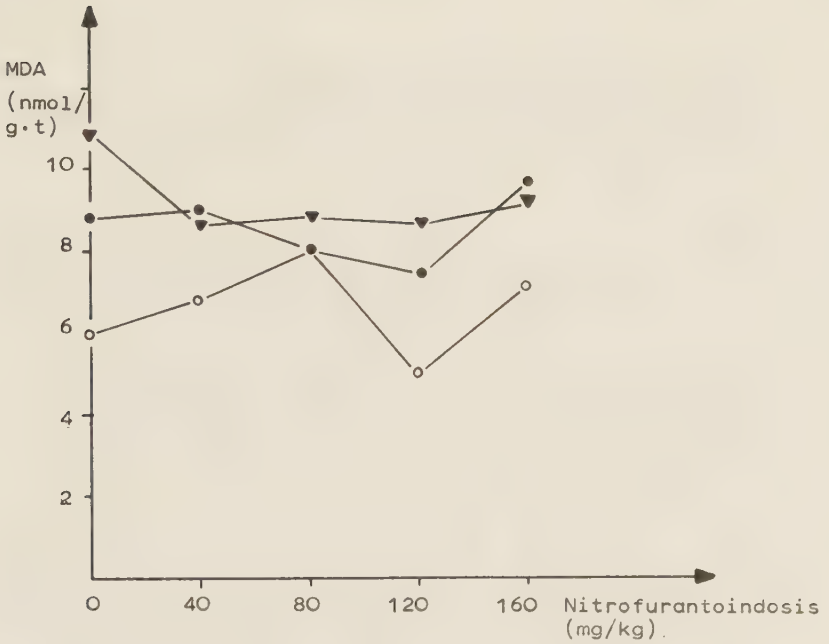


Abb. 20: MDA-Bildung in Abhängigkeit von der Nitrofurantoindosis ohne Beeinflussung (○), nach Xanthin (●) und nach Allopurinol (▼)

Die Kurven zeigen qualitativ einen gleichartigen Verlauf wie bei den Versuchen mit Phenobarbital und Piperonylbutoxid. Auch nach Xanthin oder Allopurinol kommt es nur bei den Ethanwerten zu einer deutlichen dosisabhängigen Verminderung.

6.2.4 Versuche mit Eisenvorbehandlung

Die Ergebnisse nach Vorbehandlung mit Eisen(II)-sulfat und Eisen(III)-hydroxid-Dextran-Komplex sind in den Tabellen 15 und 16 aufgeführt.

Tab. 15: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Produktion in Abhängigkeit von der Nitrofurantoindosis nach Vorbehandlung mit Eisen(II)-sulfat

Nitrofurantoin-dosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	8,24	1,70	8,25
	$s_{\bar{x}}$	1,36	0,16	0,20
40 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	16,28	1,24	7,01
	$s_{\bar{x}}$	1,21	0,16	0,11
80 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	21,99	2,02	7,53
	$s_{\bar{x}}$	3,79	0,19	0,77
120 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	21,66	1,59	12,07
	$s_{\bar{x}}$	0,73	0,16	1,11
160 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	19,86	2,01	10,84
	$s_{\bar{x}}$	0,82	0,32	1,08

Tab. 16: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Produktion in Abhängigkeit von der Nitrofurantoindosis nach Vorbehandlung mit Eisen(III)-hydroxid-Dextran-Komplex

Nitrofurantoin- dosis (mg/kg)	Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	4	4	4
$\bar{x}$	1,50	1,13	9,48
$s_{\bar{x}}$	0,04	0,17	1,03
40 mg/kg	4	4	4
$\bar{x}$	2,35	1,26	10,32
$s_{\bar{x}}$	0,12	0,02	1,88
80 mg/kg	4	4	4
$\bar{x}$	3,80	1,57	8,75
$s_{\bar{x}}$	0,05	0,09	1,12
120 mg/kg	4	4	4
$\bar{x}$	4,20	1,70	8,18
$s_{\bar{x}}$	0,41	0,14	0,46
160 mg/kg	4	4	4
$\bar{x}$	5,17	2,34	8,64
$s_{\bar{x}}$	0,20	0,43	0,75

In den Abbildungen 21, 22 und 23 sind die Ergebnisse aus den Tabellen 15 und 16 zusammen mit den Dosis-Wirkungs-Kurven ohne Vorbehandlung graphisch dargestellt.

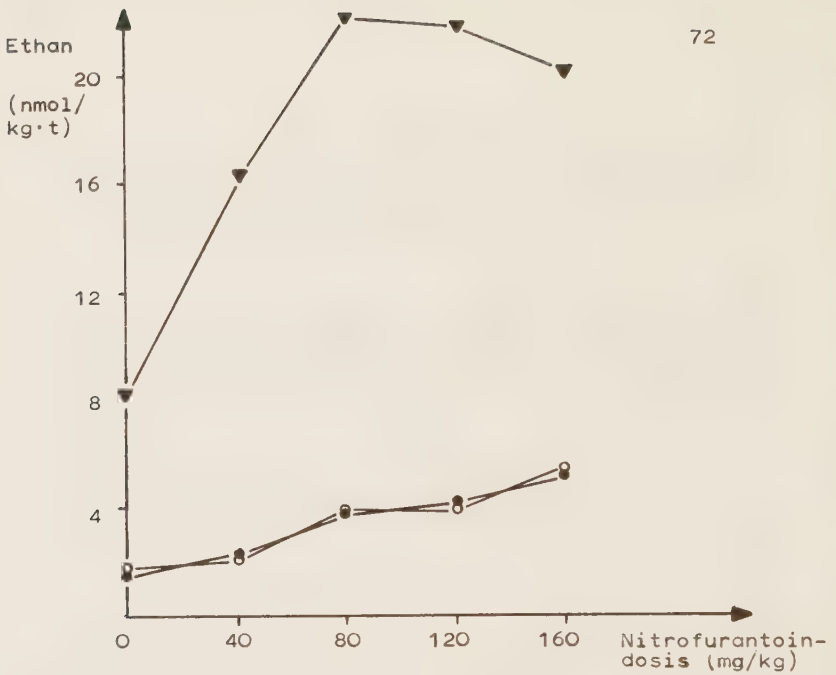


Abb. 21: Ethanexpiration in Abhängigkeit von der Nitrofurantoin-dosis ohne Vorbehandlung (○), nach Vorbehandlung mit Fe^{2+} -Ionen (▼) und Fe^{3+} -Ionen (●)

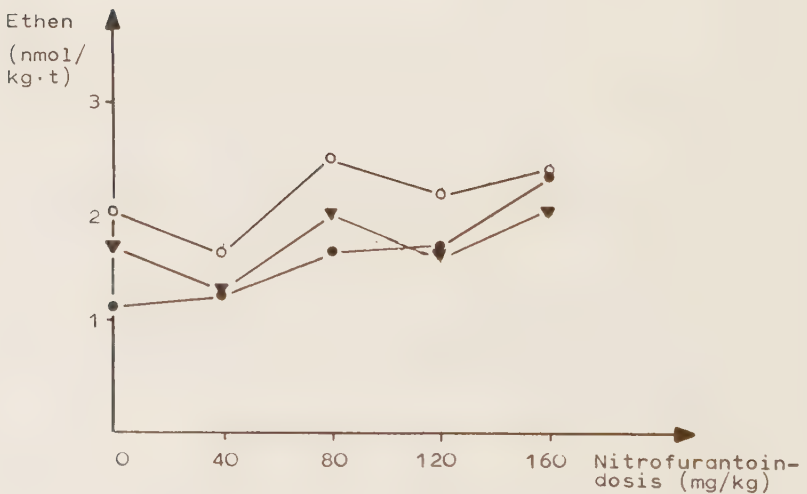


Abb. 22: Ethenexpiration in Abhängigkeit von der Nitrofurantoin-dosis ohne Vorbehandlung (○), nach Vorbehandlung mit Fe^{2+} -Ionen (▼) und Fe^{3+} -Ionen (●)

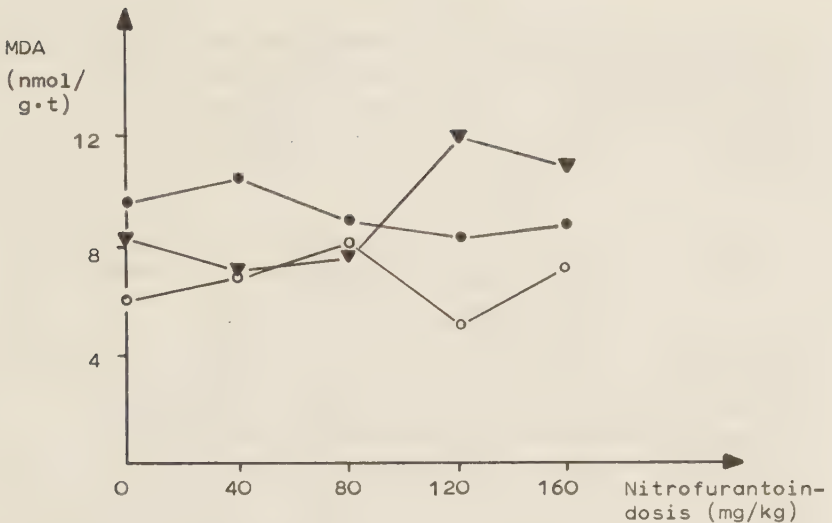


Abb. 23: MDA-Produktion in Abhängigkeit von der Nitrofurantoindosis ohne Vorbehandlung (○), nach Vorbehandlung mit Fe²⁺-Ionen (▼) und Fe³⁺-Ionen (●)

Während die Vorbehandlung mit Fe²⁺-Ionen zu einer starken Erhöhung der Ethanproduktion unter den Versuchsbedingungen führt, wird durch die Fe³⁺-Ionen die Ethanentwicklung nicht beeinflusst. Eine Abhängigkeit der Ethen- und MDA-Produktion von der Nitrofurantoindosis ist auch nach Vorbehandlung mit Eisenionen nicht zu erkennen.

6.2.5 Versuche mit DEM-Vorbehandlung

Nach Glutathionverarmung mit DEM wurden für die Bestimmung der flüchtigen Kohlenwasserstoffe Nitrofurantoin Dosen bis 60 mg/kg Körpermasse appliziert. Die Dosisabstufungen betrugen 20 mg/kg Körpermasse. Der Dosierungsbereich für die Bestimmung der MDA-Konzentration in der Leber erstreckte sich bis 120 mg/kg Körper-

masse. Höhere Nitrofurantoinmengen erwiesen sich in Kombination mit der DEM-Vorbehandlung als zu toxisch. Um einen Vergleich zu ermöglichen wurde die Dosis-wirkungs-Kurve mit nicht vorbehandelten Tieren ergänzt.

Tab. 17: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Produktion in Abhängigkeit von der Nitrofurantoindosis nach DEM-Vorbehandlung

Nitrofurantoin-dosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,69	1,46	7,73
	$s_{\bar{x}}$	0,15	0,32	0,74
20 mg/kg	n	4	4	
	$\bar{x}$	2,26	1,23	
	$s_{\bar{x}}$	0,36	0,23	
40 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	3,33	2,31	9,15
	$s_{\bar{x}}$	0,32	0,65	1,33
60 mg/kg	n	4	4	
	$\bar{x}$	4,96	2,23	
	$s_{\bar{x}}$	0,60	0,48	
80 mg/kg	n			4
	$\bar{x}$			9,74
	$s_{\bar{x}}$			1,16
120 mg/kg	n			4
	$\bar{x}$			8,76
	$s_{\bar{x}}$			1,11

Tab. 18: Kohlenwasserstoffexspiration
in Abhängigkeit von der Nitrofurantoin-dosis
(Ergänzung zur Tabelle 8)

Nitrofurantoin-dosis (mg/kg)	Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)
20 mg/kg n	4	4
$\bar{x}$	1,40	1,33
$s_{\bar{x}}$	0,10	0,20
60 mg/kg n	4	4
$\bar{x}$	2,14	1,58
$s_{\bar{x}}$	0,15	0,23

In den Abbildungen 24, 25 und 26 sind die Werte aus den Tabellen 17 und 18 mit zusätzlichen Vergleichswerten von unvorbehandelten Tieren aus Tabelle 8 graphisch dargestellt.

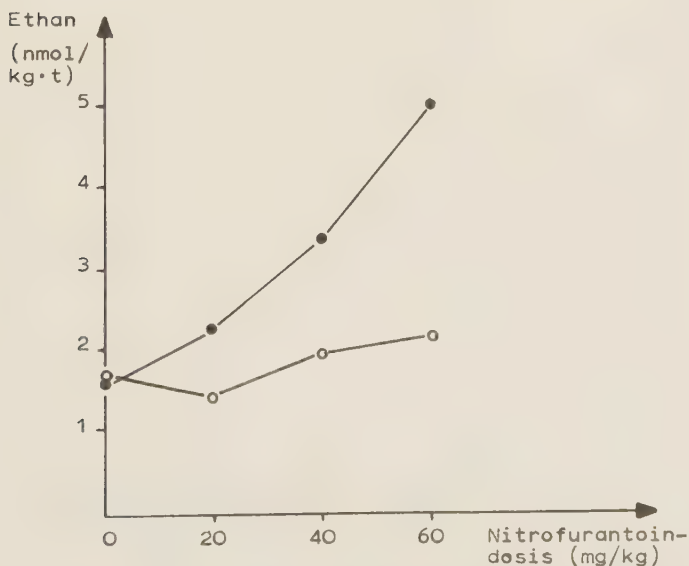


Abb. 24: Ethanproduktion in Abhängigkeit von der Nitrofurantoin-dosis ohne (○) und mit (●) DEM-Vorbehandlung

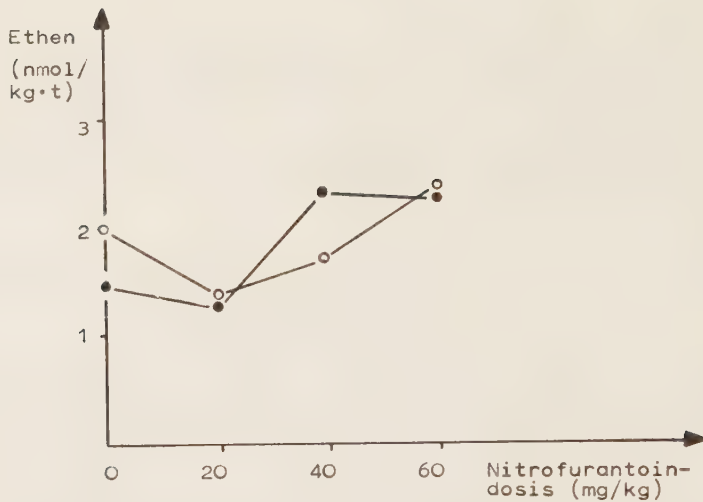


Abb. 25: Ethenproduktion in Abhängigkeit von der Nitrofurantoindosis ohne (○) und mit (●) DEM-Vorbehandlung

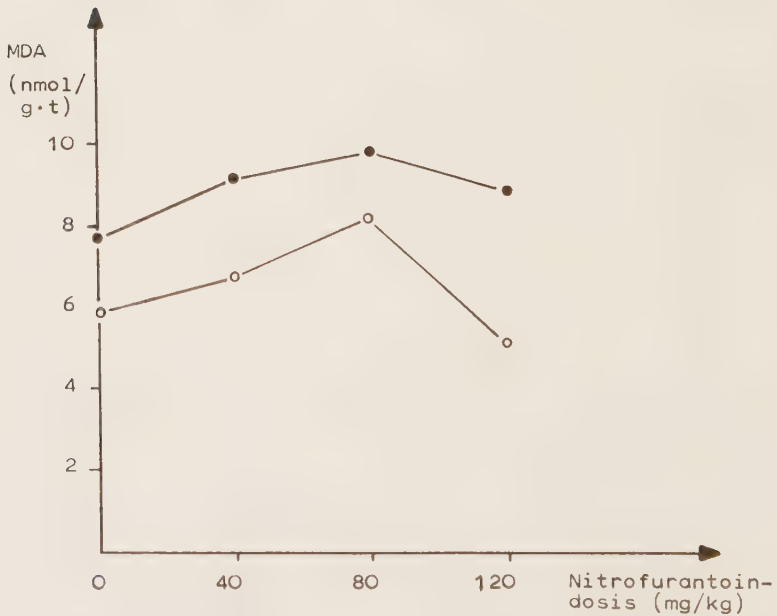


Abb. 26: MDA-Produktion in Abhängigkeit von der Nitrofurantoindosis ohne (○) und mit (●) DEM-Vorbehandlung

Die Abbildung 24 zeigt, daß nach Vorbehandlung mit Diethylmaleinat ein steiler Anstieg der Ethanentwicklung als Funktion der Nitrofurantoindosis erfolgt. Die Werte der Ethen- und Malondialdehydentwicklung lassen jedoch auch nach dieser Vorbehandlung keine Abhängigkeit von der Nitrofurantoindosis erkennen.

6.2.6 Versuche mit DEM- und Aminotriazolvorbehandlung

Die Versuchsergebnisse nach Vorbehandlung mit DEM und Aminotriazol sind in der Tabelle 19 angegeben.

Tab. 19: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Produktion in Abhängigkeit von der Nitrofurantoindosis nach Vorbehandlung mit DEM und Aminotriazol

Nitrofurantoin- dosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	3,25	2,81	10,26
	$s_{\bar{x}}$	0,18	0,32	1,20
40 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	9,98	3,12	10,77
	$s_{\bar{x}}$	2,77	0,24	1,11
80 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	16,08	3,26	10,06
	$s_{\bar{x}}$	3,06	0,46	1,06
120 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	17,36	3,82	9,03
	$s_{\bar{x}}$	2,21	0,78	0,43

Die Abbildungen 27-29 zeigen den Einfluß der Vorbehandlung mit Diethylmaleinat und Aminotriazol auf die Produktion von flüchtigen Kohlenwasserstoffen und Malondialdehyd.

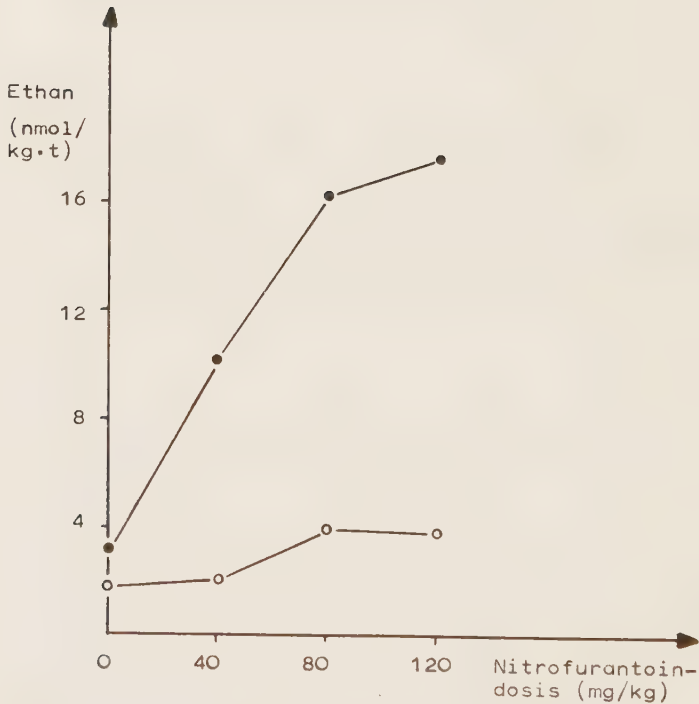


Abb. 27: Ethanexspiration in Abhängigkeit von der Nitrofurantoin-dosis ohne Vorbehandlung (○) und nach Vorbehandlung mit DEM und Aminotriazol (●)

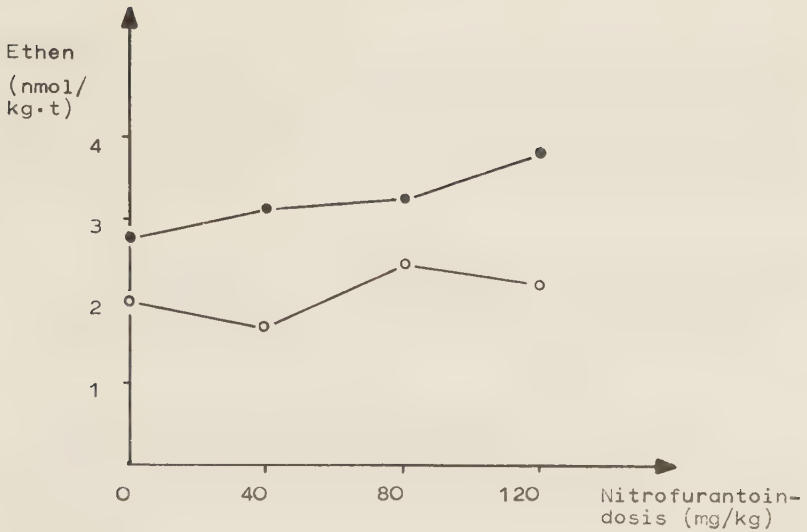


Abb. 28: Ethenexpiration in Abhängigkeit von der Nitrofurantoindosis ohne Vorbehandlung (○) und nach Vorbehandlung mit DEM und Amino-triazol (●)

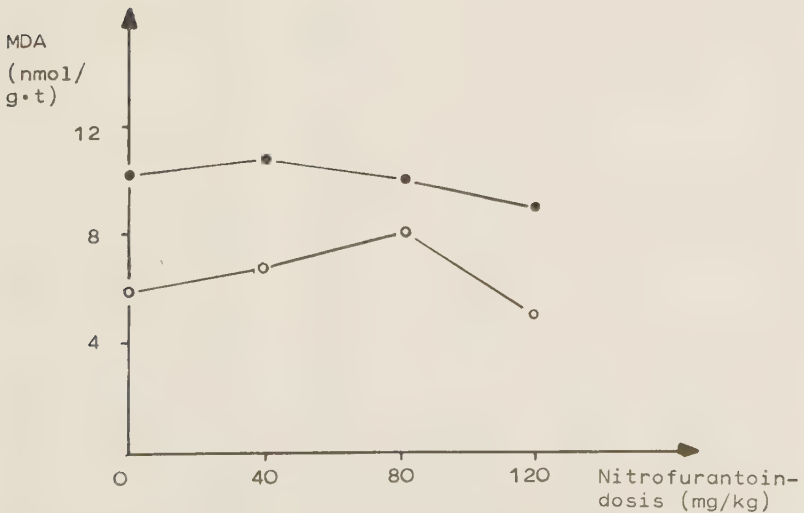


Abb. 29: MDA-Produktion in Abhängigkeit von der Nitrofurantoindosis ohne Vorbehandlung (○) und nach Vorbehandlung mit DEM und Amino-triazol (●)

Die Vorbehandlung mit Diethylmaleinat und Amino-triazol verursacht im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Tieren bei der Ethanexspiration eine starke Steigerung. Die Ethenexspiration und Malondialdehydentwicklung werden nicht dosisabhängig verändert.

6.3 Testversuche mit Nifurprazin

Nachfolgend werden die Untersuchungsergebnisse nach intraperitonealer Applikation von Nifurprazin an Versuchstiere dargestellt.

6.3.1 Versuche mit verschiedenem Sauerstoffpartialdruck

In den Tabellen 20, 21 und 22 sind die Ergebnisse bei einem PO_2 von 20, 15 und 100 Vol% im Exsikkatorgas angegeben.

Tab. 20: Kohlenwasserstoffexspiration, MDA-Bildung und GSH-Gehalt in der Leber bei einem PO_2 von 20 Vol%

Nifurprazin-dosis (mg/kg)	Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)	GSH (%)
0 mg/kg n	4	4	4	
$\bar{x}$	1,75	2,00	5,97	
$s_{\bar{x}}$	0,20	0,14	0,79	
40 mg/kg n	4	4	4	4
$\bar{x}$	1,47	1,26	10,26	97,5
$s_{\bar{x}}$	0,04	0,12	1,13	4,7
80 mg/kg n	4	4	4	4
$\bar{x}$	1,63	1,09	9,80	94,8
$s_{\bar{x}}$	0,13	0,09	0,88	14,9
120 mg/kg n	4	4	4	4
$\bar{x}$	1,63	1,27	9,16	100,1
$s_{\bar{x}}$	0,18	0,07	0,67	12,6

Fortsetzung Tab. 20:

Nifurprazin- dosis (mg/kg)	Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)	GSH (%)
160 mg/kg n	4	4	4	4
$\bar{x}$	1,78	1,15	11,23	92,5
$s_{\bar{x}}$	0,19	0,13	1,39	9,2

Tab. 21: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Bildung
in der Leber bei einem PO_2 von 15 Vol%

Nifurprazin- dosis (mg/kg)	Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg n	4	4	4
$\bar{x}$	1,27	1,46	14,93
$s_{\bar{x}}$	0,10	0,17	1,68
40 mg/kg n	4	4	4
$\bar{x}$	1,81	1,28	5,84
$s_{\bar{x}}$	0,36	0,21	0,40
80 mg/kg n	4	4	4
$\bar{x}$	2,59	1,62	6,88
$s_{\bar{x}}$	0,35	0,08	1,53
120 mg/kg n	4	4	4
$\bar{x}$	2,48	1,43	6,75
$s_{\bar{x}}$	0,45	0,15	1,74
160 mg/kg n	4	4	4
$\bar{x}$	2,73	1,38	7,92
$s_{\bar{x}}$	0,32	0,16	1,34

Tab. 22: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Bildung
in der Leber bei einem PO_2 von 100 Vol%

Nifurprazin- dosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,35	1,55	12,72
	$s_{\bar{x}}$	0,08	0,18	2,10
40 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,60	1,40	6,82
	$s_{\bar{x}}$	0,21	0,17	0,62
80 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,43	1,91	8,25
	$s_{\bar{x}}$	0,27	0,54	0,96
120 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,34	1,63	9,09
	$s_{\bar{x}}$	0,47	0,15	1,29
160 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,64	1,69	8,44
	$s_{\bar{x}}$	0,23	0,32	1,13

Die Ergebnisse der Untersuchungen nach Verabreichung von Nifurprazin bei unterschiedlichem PO_2 sind in den Abbildungen 30-33 graphisch veranschaulicht.

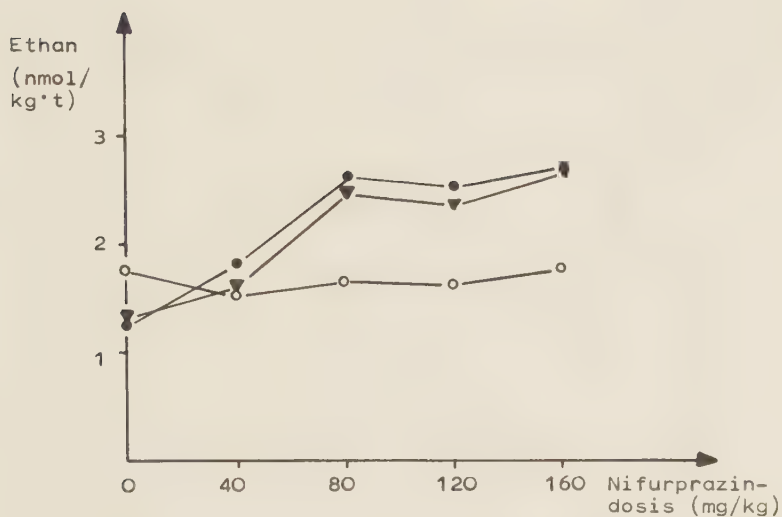


Abb. 30: Ethanexpiration als Funktion der Nifurprazindosis bei einem PO₂ von 15 (●), 20 (○) und 100 Vol% (▼)

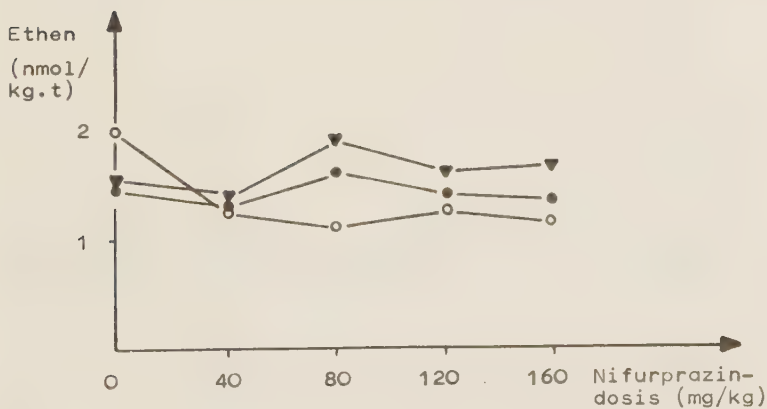


Abb. 31: Ethenexpiration als Funktion der Nifurprazindosis bei einem PO₂ von 15 (●), 20 (○) und 100 Vol% (▼)

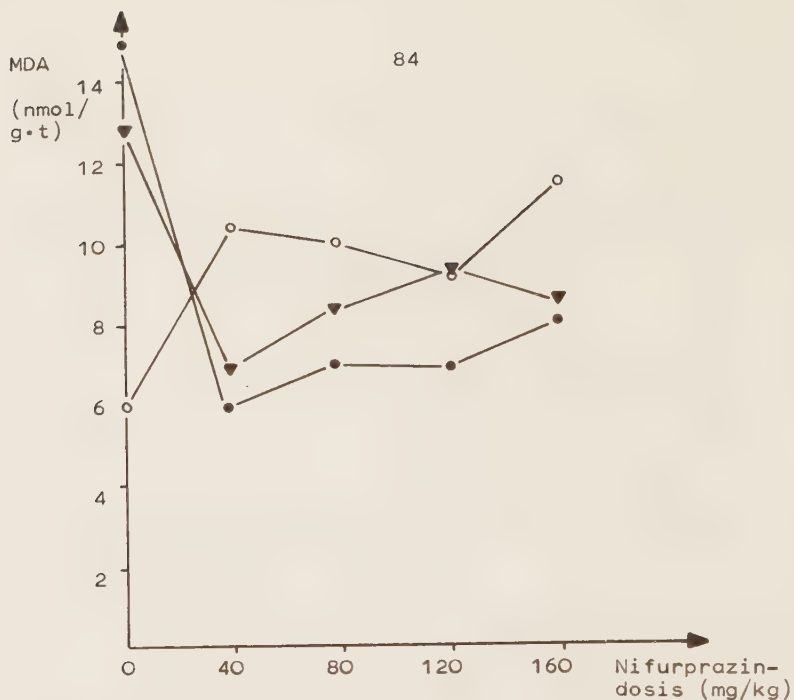


Abb. 32: MDA-Bildung als Funktion der Nifurprazindosis bei einem PO₂ von 15 (●), 20 (○) und 100 (▼) Vol%

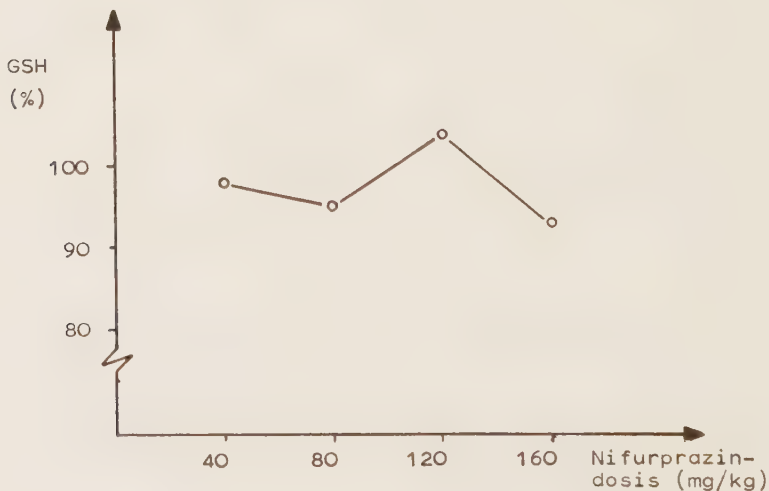


Abb. 33: GSH-Konzentration in der Leber als Funktion der Nifurprazindosis bei einem PO₂ von 20 Vol%

Die Ergebnisse bei einem PO_2 von 20 Vol% zeigen, daß sich die Expiration von flüchtigen Kohlenwasserstoffen durch Nifurprazin nicht steigern läßt. Die Dosis-Wirkungs-Kurve der MDA-Bildung besitzt eine ansteigende Tendenz. Eine Senkung des Glutathionspiegels in der Leber durch Nifurprazin ist nicht erkennbar.

Sowohl ein erniedrigter, als auch ein erhöhter Sauerstoffpartialdruck führt nach Nifurprazinapplikation zu einer etwas verstärkten Ethanexpiration. Die Ethenexpiration wird durch den Sauerstoffgehalt der Luft nur unwesentlich beeinflußt. Die Malondialdehydbildung in der Leber wird durch Nifurprazin bei verändertem Sauerstoffpartialdruck erniedrigt.

Alle folgenden Versuche mit Nifurprazin wurden bei einem PO_2 von 20 Vol% durchgeführt.

6.3.2 Versuche mit Phenobarbital- oder Piperonyl-butoxidvorbehandlung

Die Ergebnisse bei den Versuchen mit Nifurprazin nach Vorbehandlung mit Phenobarbital oder Piperonyl-butoxid sind in den Tabellen 23 und 24 dargestellt.

Tab. 23: Kohlenwasserstoffexpiration und MDA-Produktion in der Leber in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis nach Vorbehandlung mit Phenobarbital

Nifurprazindosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,17	1,02	8,97
	$s_{\bar{x}}$	0,06	0,11	1,27
40 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,68	1,32	9,61
	$s_{\bar{x}}$	0,16	0,18	1,07

Nifurprazin- dosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
80 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,01	1,34	8,24
	$s_{\bar{x}}$	0,17	0,13	0,89
120 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,91	1,41	5,78
	$s_{\bar{x}}$	0,22	0,18	1,24
160 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,94	1,17	8,31
	$s_{\bar{x}}$	0,22	0,08	1,40

Tab. 24: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Produktion
in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis nach
Vorbehandlung mit Piperonylbutoxid

Nifurprazin- dosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	n	8	8	8
	$\bar{x}$	2,20	1,26	9,61
	$s_{\bar{x}}$	0,31	0,10	0,70
40 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	3,59	1,57	6,69
	$s_{\bar{x}}$	0,31	0,14	0,76
80 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	3,95	1,46	6,49
	$s_{\bar{x}}$	0,21	0,19	1,10
120 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	4,62	1,77	7,14
	$s_{\bar{x}}$	0,20	0,19	0,44
160 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	4,24	1,81	5,71
	$s_{\bar{x}}$	0,22	0,21	0,38

Die Ergebnisse aus den Tabellen 23 und 24 sind in den Abbildungen 34-36 zusammen mit den Werten ohne Vorbehandlung graphisch dargestellt.

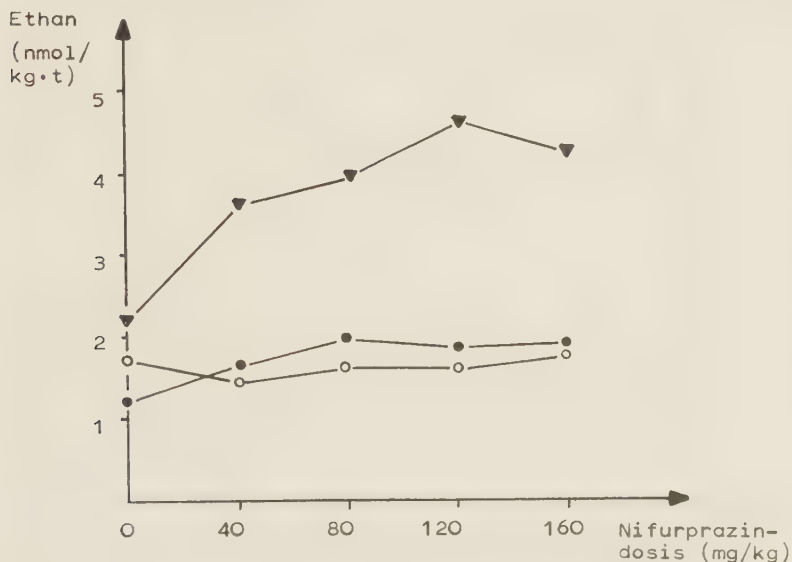


Abb. 34: Ethanexpiration in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis ohne Vorbehandlung (○), nach Phenobarbital (●) und nach Piperonylbutoxid (▼)

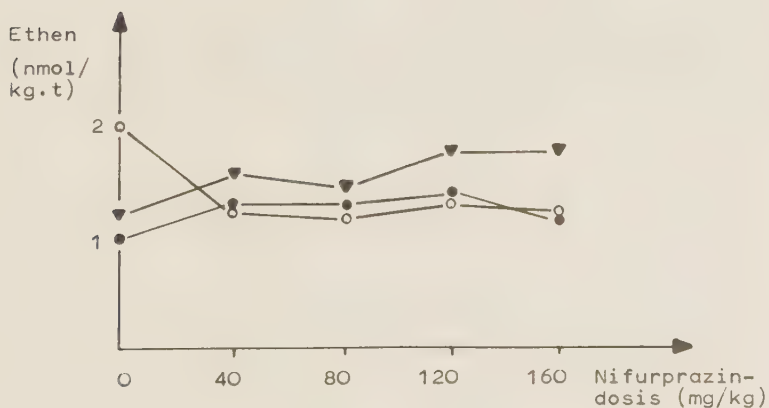


Abb. 35: Ethenexpiration in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis ohne Vorbehandlung (○), nach Phenobarbital (●) und nach Piperonylbutoxid (▼)

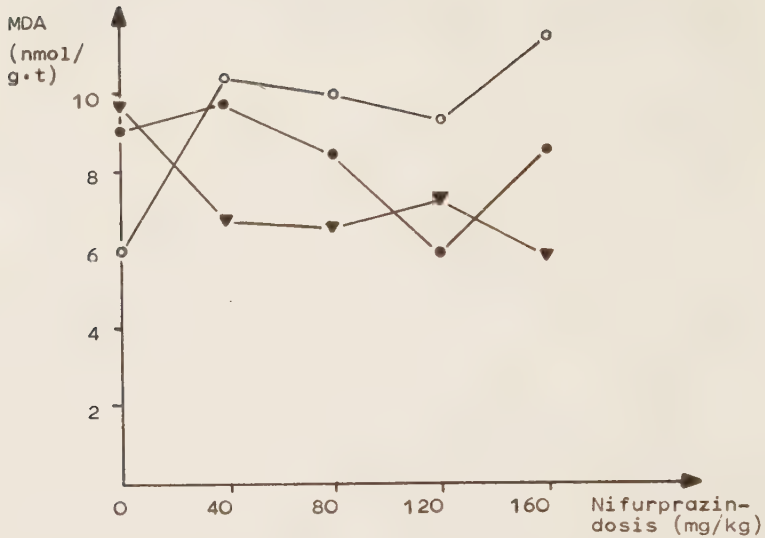


Abb. 36: MDA-Produktion in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis ohne Vorbehandlung (○), nach Phenobarbital (●) und nach Piperonylbutoxid (▼)

Die Vorbehandlung mit Phenobarbital bewirkt bei den flüchtigen Kohlenwasserstoffen und bei der MDA-Bildung keine wesentliche Veränderung. Die Vorbehandlung mit Piperonylbutoxid führt zu einer gesteigerten Ethanexspiration. Die anderen Parameter werden nach Piperonylbutoxid nicht deutlich verändert.

6.3.3 Versuche mit Xanthin- oder Allopurinolvorbehandlung

In den Tabellen 25 und 26 sind die Werte der Ethan-, Ethen- und Malondialdehydbestimmung in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis nach Vorbehandlung mit Xanthin und Allopurinol aufgeführt.

Tab. 25: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Bildung
in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis
nach Xanthinvorbehandlung

Nifurprazin- dosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,37	1,22	8,72
	$s_{\bar{x}}$	0,15	0,03	1,72
40 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,74	1,16	7,92
	$s_{\bar{x}}$	0,39	0,09	2,22
80 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,70	1,16	11,30
	$s_{\bar{x}}$	0,31	0,11	1,89
120 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	3,06	1,63	9,41
	$s_{\bar{x}}$	0,19	0,31	1,76
160 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,75	1,56	10,39
	$s_{\bar{x}}$	0,56	0,15	1,29

Tab. 26: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Produktion
in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis
nach Allopurinol

Nifurprazin- dosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	n	8	8	8
	$\bar{x}$	1,70	1,23	10,81
	$s_{\bar{x}}$	0,14	0,11	1,21
40 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,26	1,12	8,77
	$s_{\bar{x}}$	0,10	0,08	1,10
80 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,41	1,24	8,96
	$s_{\bar{x}}$	0,13	0,07	0,91
120 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,99	2,20	8,05
	$s_{\bar{x}}$	0,17	0,46	0,46
160 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,07	1,72	8,50
	$s_{\bar{x}}$	0,07	0,36	1,07

Die Ergebnisse aus den Tabellen 25 und 26 sind in den Abbildungen 37-39 zusammen mit den Vergleichswerten ohne Vorbehandlung graphisch dargestellt

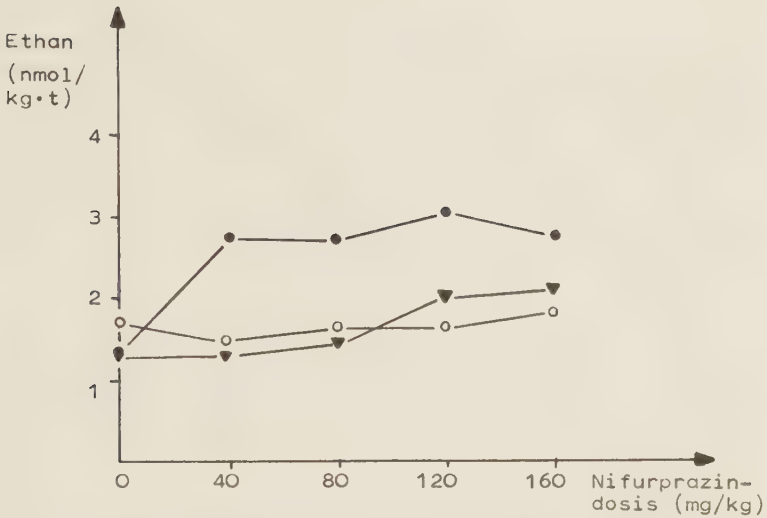


Abb. 37: Ethanexpiration in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis ohne Vorbehandlung (○), nach Xanthin (●) und nach Allopurinol (▼)

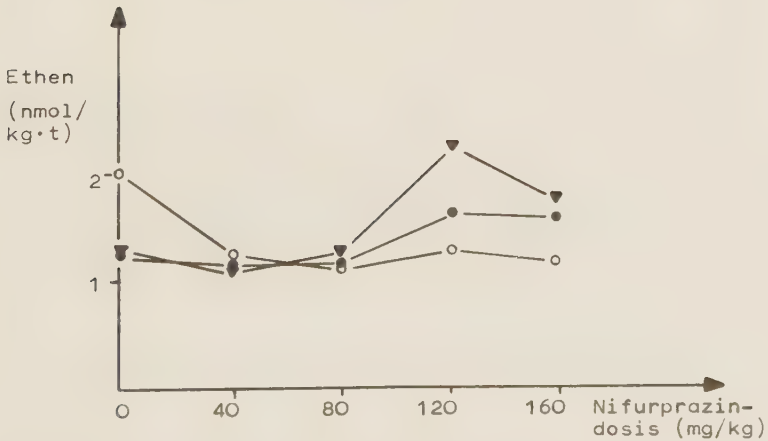


Abb. 38: Ethenexpiration in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis ohne Vorbehandlung (○), nach Xanthin (●) und nach Allopurinol (▼)

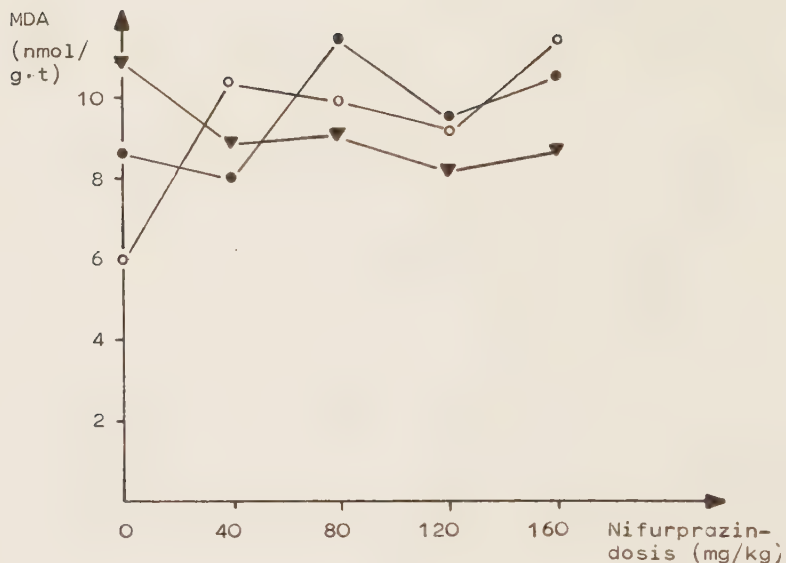


Abb. 39: MDA-Produktion in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis ohne Vorbehandlung (○), nach Xanthin (●) und nach Allopurinol (▼)

Die Vorbehandlung mit Xanthin führt nur bei Ethan zu einer deutlichen Steigerung. Die Ergebnisse der Ethen- und Malondialdehydbestimmung werden nicht verändert. Die Vorbehandlung mit Allopurinol führt bei keinem der 3 Parameter zu einer deutlichen Änderung.

6.3.4 Versuche mit Eisenvorbehandlung

Die Untersuchungsergebnisse nach Vorbehandlung mit Eisen(II)-sulfat und Eisen(III)-hydroxid-Dextran-Komplex sind in den Tabellen 27 und 28 aufgeführt.

Tab. 27: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Entwicklung in der Leber in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis nach Vorbehandlung mit Eisen(II)-sulfat

Nifurprazindosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	8,24	1,70	8,25
	$s_{\bar{x}}$	1,36	0,16	0,20
40 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	8,87	1,32	10,71
	$s_{\bar{x}}$	0,26	0,09	1,45
80 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	8,06	1,07	10,25
	$s_{\bar{x}}$	0,49	0,12	1,70
120 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	10,77	1,56	8,76
	$s_{\bar{x}}$	1,57	0,16	1,95
160 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	8,97	1,12	8,63
	$s_{\bar{x}}$	0,86	0,10	1,32

Tab. 28: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Produktion in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis nach Vorbehandlung mit Eisen(III)-hydroxid-Dextran-Komplex

Nifurprazindosis (mg/kg)	Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	4	4	4
$\bar{x}$	1,50	1,13	9,48
$s_{\bar{x}}$	0,04	0,17	1,03
40 mg/kg	4	4	4
$\bar{x}$	1,72	0,95	8,45
$s_{\bar{x}}$	0,07	0,06	1,50
80 mg/kg	4	4	4
$\bar{x}$	2,17	0,90	7,04
$s_{\bar{x}}$	0,10	0,10	1,24
120 mg/kg	4	4	4
$\bar{x}$	2,30	1,03	8,39
$s_{\bar{x}}$	0,13	0,15	1,39
160 mg/kg	4	4	4
$\bar{x}$	2,38	0,89	7,41
$s_{\bar{x}}$	0,03	0,08	1,25

Die Ergebnisse aus den Tabellen 27 und 28 sind in den Abbildungen 40-42 zusammen mit den Vergleichswerten ohne Vorbehandlung graphisch dargestellt.

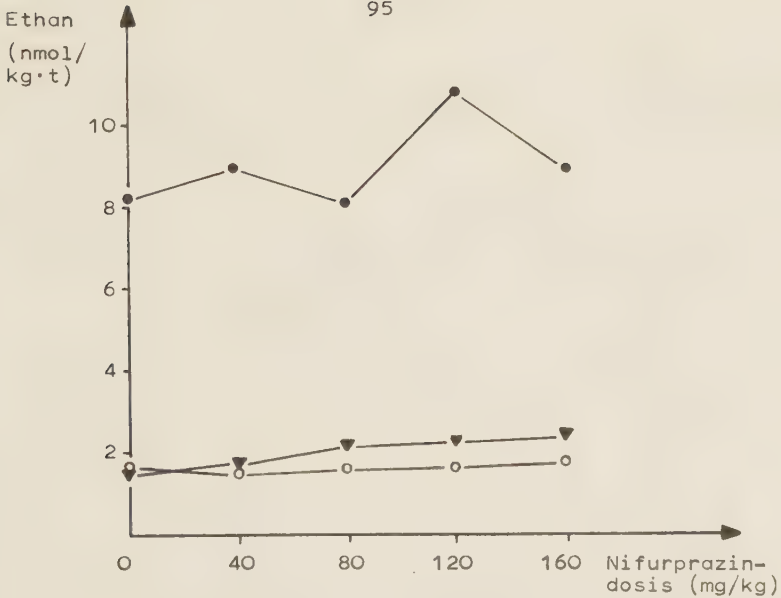


Abb. 40: Ethanexspiration in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis ohne Vorbehandlung (○), nach Vorbehandlung mit Fe^{2+} (●) und nach Vorbehandlung mit Fe^{3+} (▼)

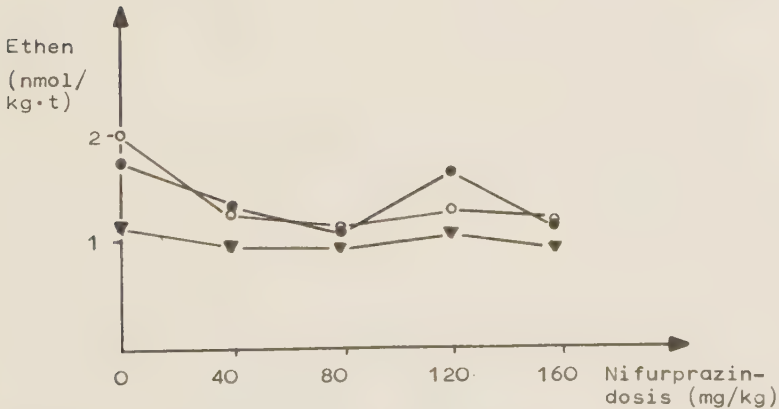


Abb. 41: Ethenexspiration in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis ohne Vorbehandlung (○), nach Vorbehandlung mit Fe^{2+} (●) und nach Vorbehandlung mit Fe^{3+} (▼)

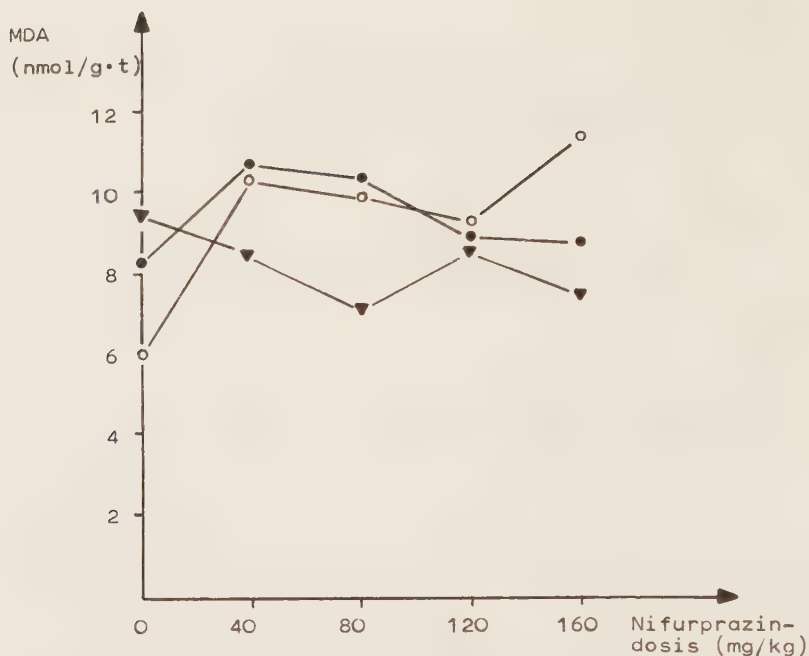


Abb. 42: MDA-Produktion in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis ohne Vorbehandlung (○), nach Vorbehandlung mit Fe^{2+} (●) und nach Vorbehandlung mit Fe^{3+} (▼)

Die Vorbehandlung mit Eisenionen führt bei den drei untersuchten Parametern zu keiner deutlichen, Nitrofuranz-spezifischen Veränderung.

6.3.5 Versuche mit DEM-Vorbehandlung

Die Ergebnisse nach Vorbehandlung mit DEM sind in der Tabelle 29 dargestellt.

Tab. 29: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Produktion in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis nach DEM-Vorbehandlung

Nifurprazindosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	1,69	1,46	7,73
	$s_{\bar{x}}$	0,15	0,32	0,74
40 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,05	1,06	8,83
	$s_{\bar{x}}$	0,11	0,13	0,70
80 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,43	1,59	10,13
	$s_{\bar{x}}$	0,15	0,16	0,59
120 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,75	1,08	8,81
	$s_{\bar{x}}$	0,09	0,05	0,83
160 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	3,05	1,50	10,32
	$s_{\bar{x}}$	0,09	0,28	0,92

Die Werte aus der Tabelle 29 sind in den Abbildungen 43-45 zusammen mit den Vergleichsdaten der Versuche ohne Vorbehandlung graphisch dargestellt.

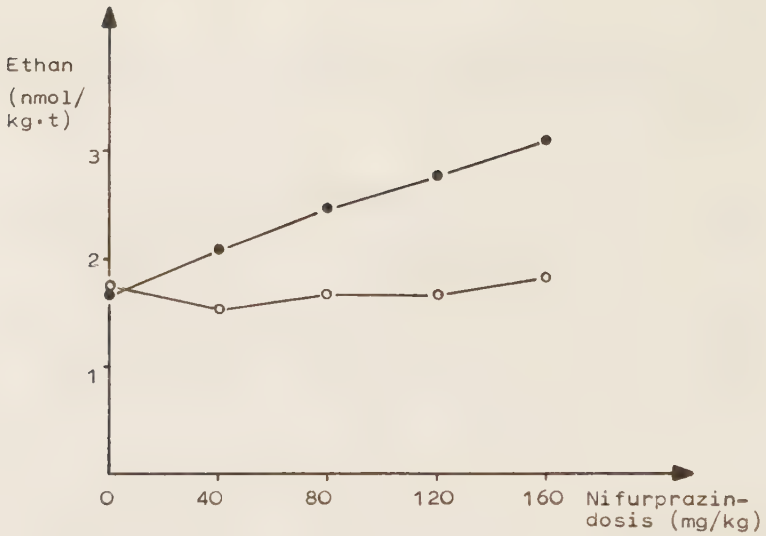


Abb. 43: Ethanexpiration in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis ohne Vorbehandlung (○) und nach Vorbehandlung mit DEM (●)

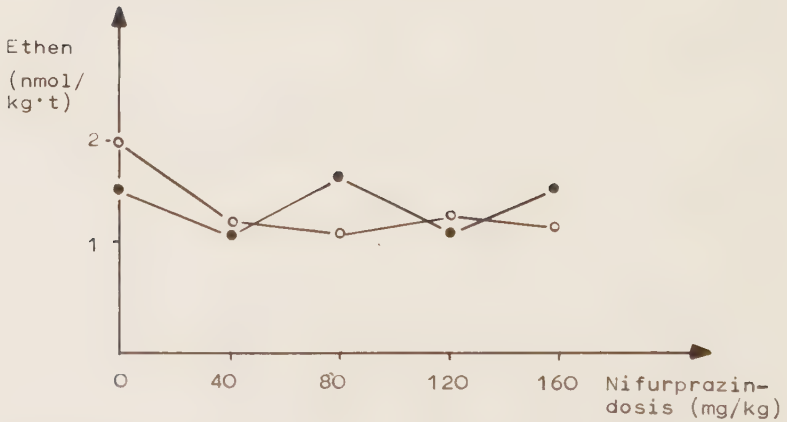


Abb. 44: Ethenexpiration in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis ohne Vorbehandlung (○) und nach Vorbehandlung mit DEM (●)

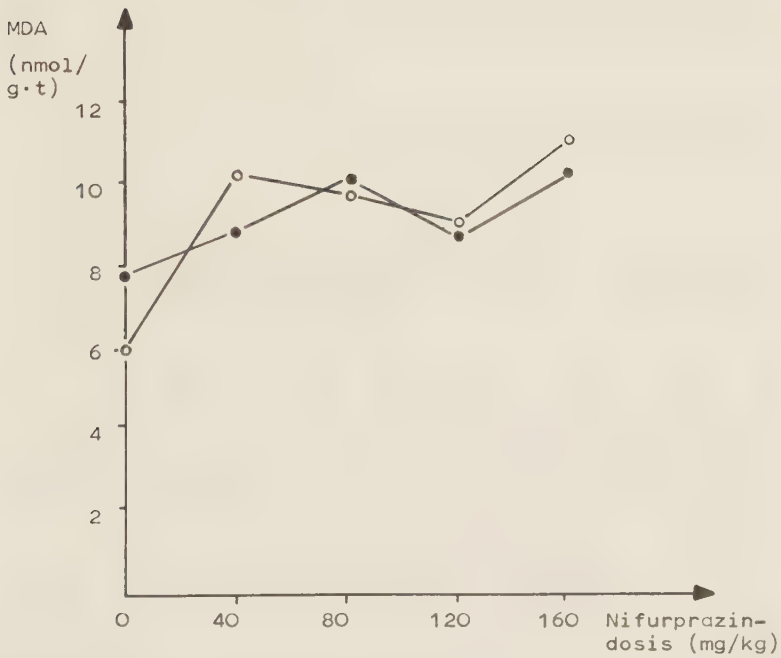


Abb. 45: MDA-Bildung in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis ohne Vorbehandlung (○) und nach Vorbehandlung mit DEM (●)

Während die Vorbehandlung mit Diethylmaleinat im Vergleich zu den Ergebnissen bei nicht vorbehandelten Tieren bei der Ethanexspiration zu einer Steigerung führt, werden die Ethen- und Malondialdehydwerte nicht verändert.

6.3.5 Versuche mit DEM- und Aminotriazol

Die Ergebnisse nach Vorbehandlung mit DEM und Aminotriazol sind in der Tabelle 30 dargestellt.

Tab. 30: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Produktion in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis nach Vorbehandlung mit DEM und Aminotriazol

Nifurprazindosis (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
0 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	3,25	2,81	10,26
	$s_{\bar{x}}$	0,18	0,32	1,20
40 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	2,76	3,91	8,44
	$s_{\bar{x}}$	0,17	0,51	1,05
80 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	3,62	4,14	9,02
	$s_{\bar{x}}$	0,35	0,47	1,05
120 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	4,00	4,07	8,64
	$s_{\bar{x}}$	0,41	0,55	0,71
160 mg/kg	n	4	4	4
	$\bar{x}$	4,30	5,10	9,09
	$s_{\bar{x}}$	0,39	1,21	0,87

Die Ergebnisse aus Tabelle 30 sind in den Abbildungen 46-48 zusammen mit den Vergleichswerten ohne Vorbehandlung graphisch dargestellt.

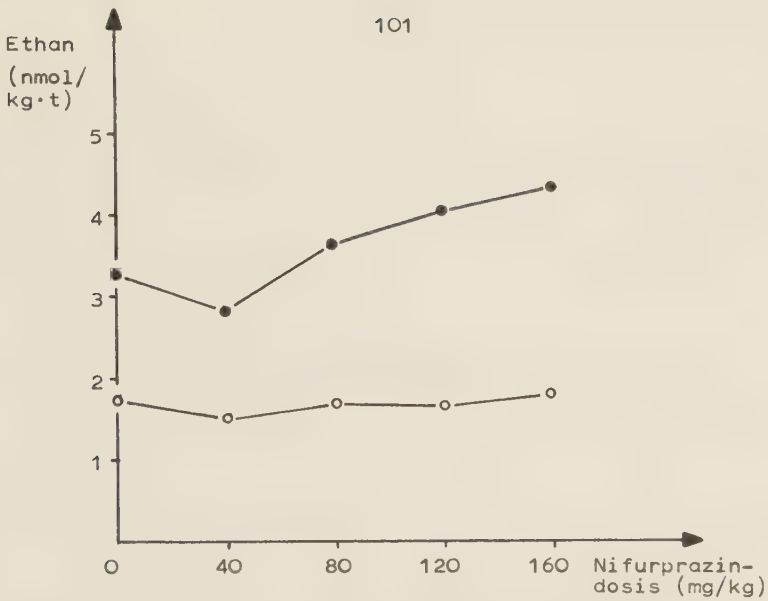


Abb. 46: Ethanexpiration in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis ohne Vorbehandlung (o) und nach Vorbehandlung mit DEM und Aminotriazol (•)

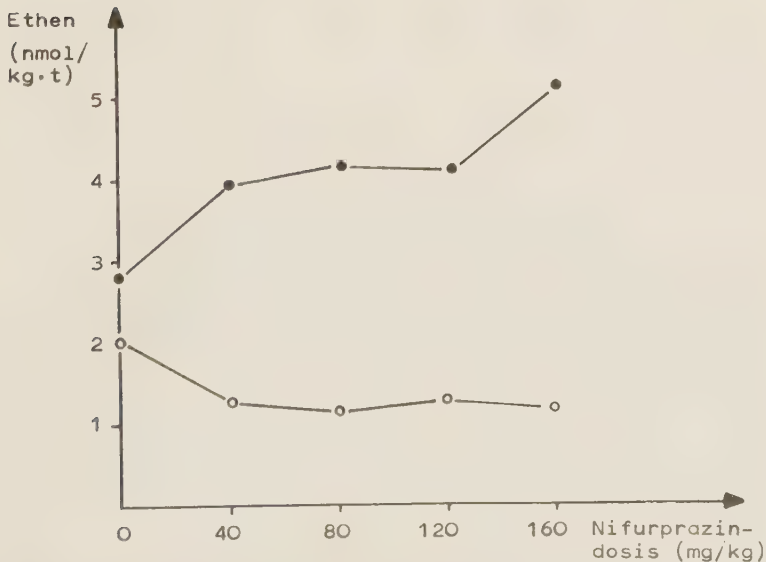


Abb. 47: Ethenexpiration in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis ohne Vorbehandlung (o) und nach Vorbehandlung mit DEM und Aminotriazol (•)

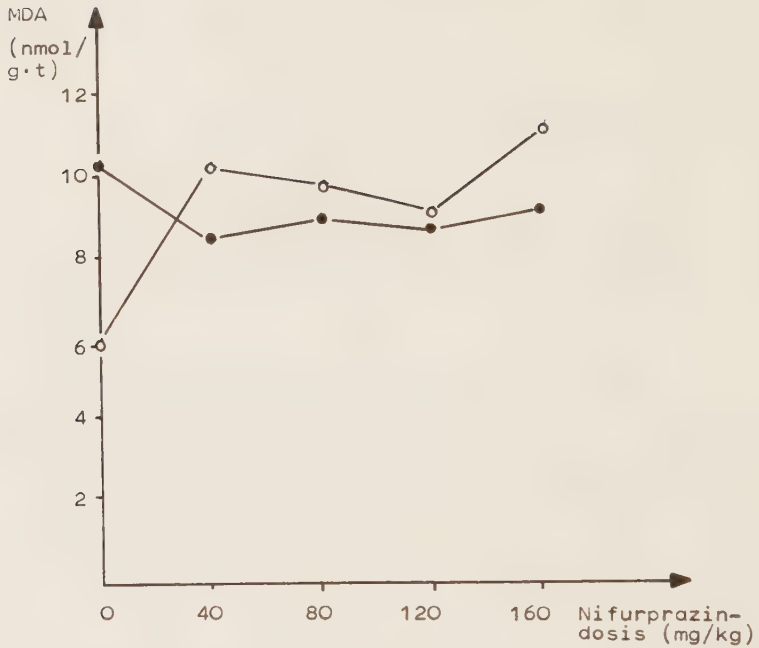


Abb. 48: MDA-Bildung in Abhängigkeit von der Nifurprazindosis ohne Vorbehandlung (○) und nach Vorbehandlung mit DEM und Aminotriazol (●)

Die Werte der Ethan- und Ethenexpiration nach Nifurprazinapplikation werden nach Anhebung des H_2O_2 -Spiegels gesteigert. Bei der Malondialdehydbildung ist keine deutliche Veränderung im Vergleich zu den Ergebnissen bei nicht vorbehandelten Tieren zu finden.

6.4 Vergleichende Zusammenfassung

Zur Vermittlung eines Gesamteindrucks werden die Versuchsergebnisse im folgenden zusammenfassend verglichen. Dabei wird eine Zunahme der einzelnen Untersuchungsparameter mit +, eine Abnahme mit - und keine Änderung mit o symbolisiert.

Bezugsgrößen des Vergleiches sind

- a) bei unvorbehandelten Versuchstieren mit normalem Sauerstoffpartialdruck (20 Vol%) im Atemgas (Tab. 31), der Ausgangswert ohne Verabreichung von Nitrofuranen (Nitrofurandosis = 0 mg/kg);
- b) bei unvorbehandelten Versuchstieren mit reduziertem (15 Vol%) oder erhöhtem Sauerstoffpartialdruck (100 Vol%) im Atemgas (Tab. 31) sowie bei allen vorbehandelten Versuchstieren (Tab. 32 bis 36), die Ergebnisse der unvorbehandelten Versuchstiere mit normaler Sauerstoffbeatmung.

6.4.1 Einfluß des Sauerstoffpartialdruckes

Über den Einfluß des Sauerstoffpartialdruckes im Atemgas der Versuchstiere informiert folgende Gegenüberstellung.

Tab. 31: Beeinflussung der Kohlenwasserstoffakkumulation im Exsikkator sowie der MDA- und GSH-Konzentration in der Leber durch den PO_2 im Atemgas

Substanz	Nitrofurantoin			Nifurprazin		
	15	20	100	15	20	100
PO_2 (Vol%)	15	20	100	15	20	100
Ethan	-	+	o	+	o	+
Ethen	o	o	o	o	o	o
MDA	-	o	o	-	+	-
GSH	-			o		

- Aus Tabelle 31 läßt sich entnehmen, daß
- eine Nitrofurantoinbelastung bei normalem Sauerstoffpartialdruck (20 Vol%) die Ethanakkumulation steigert und die GSH-Konzentration der Leber senkt, während eine Nifurprazinbelastung beide Parameter nicht beeinflußt, jedoch die Malondialdehydbildung in der Leber erhöht, daß
 - Nitrofurantoin bei erniedrigtem Sauerstoffpartialdruck eine Abnahme der Ethanakkumulation sowie der Malondialdehydbildung hervorruft, und daß
 - Nifurprazin bei verändertem (erniedrigtem und erhöhtem) Sauerstoffpartialdruck eine Zunahme der Ethanakkumulation und einen Abfall der Malondialdehydbildung verursacht.

6.4.2 Versuchstiovorbehandlung mit Phenobarbital und Piperonylbutoxid

Die nächste Gegenüberstellung beschreibt den Effekt einer Vorbehandlung der Versuchstiere mit Phenobarbital oder Piperonylbutoxid.

Tab. 32: Beeinflussung der Kohlenwasserstoffakkumulation im Exsikkator sowie der MDA-Konzentration der Leber durch Phenobarbital bzw. Piperonylbutoxid

Substanz	Nitrofurantoin		Nifurprazin	
	Phen	Pip	Phen	Pip
Ethan	-	-	o	+
Ethen	o	o	o	o
MDA	o	o	o	o

Phen: Phenobarbital; Pip: Piperonylbutoxid

Die Vorbehandlung mit Phenobarbital verursacht bei Nitrofurantoinbelastung eine verminderte Ethanakkumulation.

Eine Vorbehandlung mit Piperonylbutoxid ergibt

- bei Nitrofurantoinbelastung eine geringere Ethanakkumulation und
- bei Nifurprazinbelastung eine Steigerung der Ethan-anreicherung.

6.4.3 Versuchstiovorbehandlung mit Xanthin und Allopurinol

Der Vergleich einer Versuchstiovorbehandlung mit Xanthin oder Allopurinol geht aus Tabelle 33 hervor.

Tab. 33: Beeinflussung der Kohlenwasserstoffakkumulation im Exsikkator sowie der MDA-Konzentration der Leber durch Xanthin bzw. Allopurinol

Substanz	Nitrofurantoin		Nifurprazin	
	Xan	Allo	Xan	Allo
Vorbehandlung				
Ethan	-	-	+	o
Ethen	o	o	o	o
MDA	o	o	o	o

Allo: Allopurinol; Xan: Xanthin

An den Ergebnissen von Tabelle 33 fällt auf, daß

- eine Vorbehandlung mit Xanthin die Ethanakkumulation bei Nitrofurantoinbelastung senkt und bei Nifurprazinbelastung steigert, und daß
- eine Vorbehandlung mit Allopurinol die Ethanakkumulation bei Nitrofurantoinbelastung senkt.

6.4.4 Versuchstiervorbehandlung mit

Eisen(II)-sulfat oder Eisen(III)-dextran

Die Ergebnisse der Versuchstiervorbehandlung mit Eisen(II)- oder Eisen(III)-verbindungen sind in Tabelle 34 gegenübergestellt.

Tab. 34: Beeinflussung der Kohlenwasserstoffakkumulation im Exsikkator sowie der MDA-Konzentration der Leber durch Fe(II)-sulfat oder Fe(III)-dextran

Substanz	Nitrofurantoin		Nifurprazin	
	Fe(II)	Fe(III)	Fe(II)	Fe(III)
Ethan	+	o	o	o
Ethen	o	o	o	o
MDA	o	o	o	o

Fe(II): Eisen(II)-sulfat; Fe(III): Eisen(III)-dextran

Tabelle 34 zeigt, daß eine Eisen(II)-Vorgabe die Ethanakkumulation bei Nitrofurantoinbelastung, nicht jedoch bei Nifurprazinapplikation steigert.

6.4.5 Versuchstiervorbehandlung mit Diethylmaleinat

In einem weiteren Vergleich folgen in Tabelle 35 die Ergebnisse der Versuchstiervorbehandlung mit Diethylmaleinat.

Tab. 35: Beeinflussung der Kohlenwasserstoffakkumulation im Exsikkator sowie der MDA-Konzentration der Leber durch Diethylmaleinat

Substanz	Nitrofurantoin	Nifurprazin
Ethan	+	+
Ethen	o	o
MDA	o	o

Aus Tabelle 35 geht hervor, daß eine Vorbehandlung der Versuchstiere mit Diethylmaleinat die Ethanakkumulation steigert, aber keinen Einfluß auf die Malondialdehydbildung hat.

6.4.6 Versuchstievorbehandlung mit Diethylmaleinat plus Aminotriazol

Im letzten Vergleich sind die Ergebnisse der Versuchstievorbehandlung mit Diethylmaleinat und Aminotriazol gegenübergestellt und in Tabelle 36 zusammengefaßt.

Tab. 36: Beeinflussung der Kohlenwasserstoffakkumulation im Exsikkator sowie der MDA-Konzentration der Leber durch Diethylmaleinat u n d Aminotriazol

Substanz	Nitrofurantoin	Nifurprazin
Ethan	+	+
Ethen	o	+
MDA	o	o

Die in Tabelle 36 dargestellten Effekte gleichen den Wirkungen einer Vorbehandlung der Versuchstiere mit Diethylmaleinat (s. Tab. 35).

IV Diskussion

Mit den durchgeführten Untersuchungen ist das Ziel verfolgt worden, experimentell zu klären, ob Nitrofurantoin (Furadantin^R) und Nifurprazin (Carofur^R) in vivo zu radikalischen Metaboliten umgesetzt werden, und ob in dieser Hinsicht Unterschiede zwischen einem kanzerogenen (Nifurprazin) und einem nicht kanzerogenen Nitrofuranderivat (Nitrofurantoin) bestehen.

Untersuchungsparameter. Den experimentell bestimmten Untersuchungsparametern (Ethan, Ethen, Malondialdehyd, Glutathionabnahme) wird folgende biologische Bedeutung zugeordnet:

E t h a n ist ein Zerfallsprodukt radikalisch geschädigter ungesättigter Fettsäuren von zellularen und subzellulären Membranlipiden (Cohen et al. 1968; Riely et al. 1974).

E t h e n entsteht u. a. bei der Oxidation von Ethanradikalen (d. h. Folgeprodukten oxidativ geschädigter Membranlipide), z. B. durch Redoxmetalle (Dumelin und Tappel 1977; Sosnowsky und Rawlinson 1971):



Es fällt auch an bei radikalischer Zersetzung von Methionin und Methional (Beauchamp und Fridovich 1970; Lieberman und Kunishi 1965).

M a l o n d i a l d e h y d gilt gleichfalls als Reaktionsprodukt von radikalisch bzw. oxidativ geschädigten Fettsäuren (Abramson 1949; Bernheim et al. 1945; Dahle et al. 1962) und soll hauptsächlich aus Phospholipid-Arachidonat entstehen (Niehaus und Samuelson 1968).

Reduziertes G l u t a t h i o n wird "verbraucht" bei der Reaktion mit Sauerstoffradikalen und/oder energetisch angeregtem Sauerstoff, und bei der enzymkatalysierten (GSH-S-Transferasen) und spontanen Reaktion mit Elektrophilen (Mitchell et al. 1984).

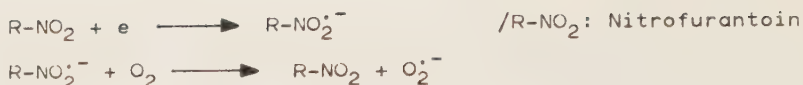
Unter diesen Umständen wird man deshalb davon ausgehen dürfen, daß die erfaßten Untersuchungsparameter Radikale und sonstige oxidierende Intermediate anzeigen. Es ist jedoch bekannt, daß nicht alle Parameter unter solchen Umständen gleichzeitig auftreten müssen (Schmid et al. 1983). Daraus ergibt sich, daß die *A b w e s e n h e i t* des einen oder anderen Parameters keineswegs die Abwesenheit von radikalischen und sonstigen oxidierenden Metaboliten *b e w e i s t*. Außerdem ist es naheliegend, daß solche Metaboliten bei den durchgeführten Untersuchungen dann nicht erfaßt wurden, wenn sie sofort nach der Entstehung an zelluläre Makromoleküle wie Nucleinsäuren oder Proteine etc. gebunden wurden, ohne Membranlipide zu schädigen.

Versuchsauswertung. Die Auswertung der Versuchsergebnisse ist unter Beachtung folgender Grundsätze vorgenommen worden:

- a) Als Nitrofuran-spezifisch sind nur Wirkungen bewertet worden, welche eine positive oder negative Korrelation mit der Nitrofurandosis erkennen ließen.
- b) Bei differierenden Kontrollwerten von vorbehandelten und unvorbehandelten Versuchstieren sind die Ergebnisse der vorbehandelten Tiere um den Betrag der durch die Vorbehandlung verursachten, Nitrofuran-unspezifischen Kontrollwertsdifferenz korrigiert worden.

Ergebnisse. Neben negativen Befunden sind diverse kleinere Effekte aufgetreten, denen im Gegensatz zu den folgenden Ergebnissen keine Bedeutung beigemessen wird:

Nitrofurantoin steigert bei normalem Sauerstoffpartialdruck im Atemgas der Versuchstiere (20 Vol%) die Ethanexpiration und erniedrigt die Glutathionkonzentration der Leber (Tab. 31). Dies ist mit der Annahme vereinbar, daß Nitrofurantoin in vivo zum Nitroanionradikal reduziert und von Sauerstoff unter Superoxidbildung reoxidiert wird (redox cycling; Bus und Gibson 1984; Mason und Holtzman 1975):



Offenbar werden dabei nicht alle Superoxidradikale durch Superoxiddismutasen inaktiviert, sondern als solche oder reaktive Folgeprodukte ($\text{HO}^\bullet$ etc.) u. a. von Glutathion abgefangen (Mitchell et al. 1984).

Die leichte Abnahme der Ethanexspiration bei vermindertem Sauerstoffpartialdruck (15 Vol%; Tab. 31) läßt sich mit einer Abnahme der Superoxidbildung erklären. Die ausbleibende Zunahme der Ethanexspiration bei reiner Sauerstoffbeatmung (Tab. 31) erweckt den Eindruck, daß Nitrofurantoin nur in beschränktem Umfang zum Anionradikal ($\text{R-NO}_2^{\bullet -}$) reduziert wird, so daß seine Reoxidation in vivo schon bei normalem Sauerstoffgehalt des Atemgases praktisch quantitativ erfolgt.

Im Gegensatz zum Nitrofurantoin ist bei Nifurprazin weder eine Ethanbildung noch eine Abnahme der GSH-Konzentration bei normalem Sauerstoffpartialdruck im Atemgas der Versuchstiere nachweisbar, wohl aber eine leichte Malondialdehydbildung (Tab. 31). Man kann dies zunächst als unterbleibende Induktion von "reaktiven Sauerstoffspezies" ($\text{O}_2^{\bullet -}$, $\text{HO}^\bullet$ etc.) interpretieren, würde aber angesichts der Malondialdehydbildung wahrscheinlich zu weit gehen mit der Annahme, daß keine radikalischen Nifurprazinmetaboliten in vivo gebildet werden. Zur Vorsicht mahnt auch die leichte Zunahme der Ethanexspiration bei verändertem Sauerstoffpartialdruck (Tab. 31). Möglicherweise entstehen bei normalem Sauerstoffpartialdruck Nifurprazinmetaboliten, welche überwiegend an zelluläre Makromoleküle gebunden und von Malondialdehyd angezeigt werden (Schmid 1984), während bei verändertem Sauerstoffpartialdruck auch Sauerstoffradikale nachweisbar werden (dies ist auch bei erniedrigtem Sauerstoffpartialdruck mit vermehrter Bildung von $\text{R-NO}_2^{\bullet -} \longrightarrow \text{O}_2^{\bullet -} \longrightarrow \text{HO}^\bullet$ etc. vorstellbar).

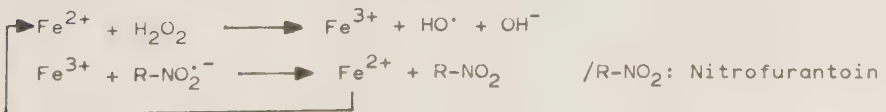
In Ubereinstimmung mit den vorstehenden Interpretationen, läßt sich die Zunahme der Ethanexspiration nach Erniedrigung der Glutathionkonzentration durch Diethylmaleinat (Tab. 35) mit einer eingeschränkten Inaktivierung von induzierten Sauerstoffradikalen etc. durch Glutathion (Mitchell et al. 1984) erklären. Dazu mag noch eine verminderte Entgiftung radikalinduzierter Peroxide durch die GSH-Peroxidasen kommen (Bus und Gibson 1984).

Zu diesen Folgen einer Erniedrigung der körpereigenen Glutathionkonzentration kommt bei den mit Diethylmaleinat und Aminotriazol vorbehandelten Versuchstieren (Tab. 36) noch ein Anstieg der endogenen Wasserstoffperoxidkonzentration infolge Inaktivierung der Katalase hinzu. Dies äußert sich bei Nitrofurantoinbelastung in einer weiteren Zunahme der Ethanexspiration, die vermutlich auf einer Bildung von Hydroxylradikalen via HABER-WEISS-Reaktion beruht:



Bei Nifurprazinbelastung der Versuchstiere verursacht die Erhöhung der endogenen Wasserstoffperoxidkonzentration einen deutlichen Anstieg der Ethanexspiration (Tab. 36), deren Zustandekommen beim derzeitigen Stand des Wissens nicht konkret beschreibbar ist. Eine Möglichkeit ist die Superoxid- und Wasserstoffperoxid-abhängige Bildung aus Methionin und/oder Methional (Beauchamp und Fridovich 1970; Saran et al. 1980).

Leichter verstehbar ist dagegen die Stimulation der Ethanexspiration bei simultaner Verabreichung von Eisen(II)-Ionen und Nitrofurantoin (Tab. 34). Sie könnte auf einer "Verstärkung" der FENTON-Reaktion beruhen (Schmid 1984):



Daß diese Reaktion bei simultaner Gabe von Eisen(III)-dextran und Nitrofurantoin nicht in Gang gekommen ist (Tab. 34), dürfte folgende Gründe haben:

- a) Eisen(III)-dextrane enthalten nur Spuren freier Fe^{3+} -Ionen;
- b) die vorhandenen Fe^{3+} -Ionen fallen bei physiologischen pH-Werten (7,0 bis 7,4) als $\text{Fe}(\text{OH})_3$ aus und/oder werden an Proteine etc. gebunden (Atzwirkung von Fe^{3+}).

Die vorstehende Interpretation der Verstärkerwirkung von Fe^{2+} -Ionen auf die Ethanexpirationsrate bei Nitrofurantoinbelastung erklärt auch in befriedigender Weise den Befund, daß Eisen(II)-Ionen bei Nifurprazinbelastung unwirksam sind (Tab. 34): Wenn Nifurprazin, wie oben erläutert, überwiegend zu kovalent gebundenen Metaboliten - weniger zu Nitro-Anionradikalen (R-NO_2^-) und Folgeprodukten - biotransformiert wird, ist eine Verstärkerwirkung auf die FENTON-Reaktion nicht zu erwarten (s. oben).

Im Zusammenhang mit den eben erörterten Versuchen ist der Hinweis angezeigt, daß die gleichzeitige Anwendung von parenteralen Eisenpräparaten und Nitrofuranen potentiell Unverträglichkeitsreaktionen zur Folge haben kann.

Es sind jetzt noch die Versuche nach Induktion und Hemmung der mischfunktionellen Monooxygenasen und der Xanthinoxidase zu erörtern. Sie vermitteln insgesamt den Eindruck, daß diese Enzymsysteme *in vivo* offenbar keinen allzugroßen Einfluß auf die Metabolisierung von *parenteral* verabreichtem Nitrofurantoin haben, da die beobachtbaren Effekte quantitativ gering ausgefallen sind.

Ob dies auch für Nifurprazin zutrifft, läßt sich anhand der erfaßten Untersuchungsparameter nicht abschließend beurteilen; die gefundene Stimulation der Ethanexpirationsrate nach Hemmung der mischfunktionellen Monooxygenasen (Tab. 32) läßt sich am ehesten mit einer Metabolisierungshemmung

des bei der Versuchsdurchführung akkumulierenden und wieder inspirierten Ethans erklären.

Zum Schluß läßt sich die eingangs der Diskussion gestellte Frage nach möglichen Metabolisierungsunterschieden zwischen kanzerogenen und nicht kanzerogenen Nitrofuranderivaten dahingehend beantworten, daß das kanzerogene Nifurprazin - im Gegensatz zum nicht kanzerogenen Nitrofurantoin - bei normalem Sauerstoffpartialdruck im Atemgas der Versuchstiere **k e i n e** Ethanexpiration, auch nicht nach Eisen(II)-Vorbehandlung, und **k e i n e** Erniedrigung der Glutathionkonzentration in der Leber hervorruft (Tab. 31 und 34). Offenbar werden die Nifurprazinmetaboliten sofort an zelluläre Makromoleküle gebunden und/oder haben keine oxidierenden Eigenschaften, so daß eine oxidative Schädigung von Membranlipiden unterbleibt.

V Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sind Nitrofurantoin (Furadantin^R) und Nifurprazin (Carofur^R) auf radikalbildende Eigenschaften in vivo untersucht worden.

Die Versuchstiere waren männliche weiße Mäuse mit einer Körpermasse von ca. 35 g aus der Zucht des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie.

Die Versuchsdurchführung erfolgte ohne vorherigen Futterentzug; beide Nitrofuranderivate wurden intra-peritoneal verabreicht. Untersuchungsparameter waren die Ethan- und Ethenexspiration, die Malondialdehydbildung in der Leber und (nicht bei allen Versuchen) die Abnahme des Glutathiongehaltes der Leber.

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- a) Nitrofurantoin steigert, im Unterschied zu Nifurprazin, die Ethanexspiration und erniedrigt den Glutathiongehalt der Leber. Die Malondialdehydbildung wird durch Nifurprazin mäßig gesteigert, die Ethenexspiration durch beide Nitrofuranderivate nicht beeinflusst.
- b) Die Ethanexspiration bei Nitrofurantoinbelastung der Versuchstiere wird durch eine parenterale Vorbehandlung mit Eisen(II)-Ionen weiter gesteigert; sie wird bei einer Nifurprazinbelastung nicht verändert.
- c) Eine ausgeprägte zusätzliche Steigerung der Ethanexspiration erfolgt bei Nitrofurantoinverabreichung auch nach einer Vorbehandlung mit Diethylmaleinat (Glutathionverarmung) und Diethylmaleinat plus Amino-triazol (Anstieg der endogenen Wasserstoffperoxidkonzentration). Bei Nifurprazinbelastung sind diese Effekte nur angedeutet; eine Anhebung der H_2O_2 -Konzentration stimuliert hier jedoch die Ethenexspiration.
- d) Eine Induktion bzw. Hemmung der - mischfunktionellen Monooxygenasen mit Phenobarbital bzw. Piperonylbutoxid und der

- Xanthinoxidase mit Xanthin bzw. Allopurinol verursacht keine eindeutige Beeinflussung der untersuchten Parameter.

Aus den Ergebnissen wird der Schluß gezogen, daß das nicht kanzerogene Nitrofurantoin zu Radikalen und Radikal-
folgeprodukten metabolisiert wird, die eine oxidative
Schädigung von zellulären und/oder subzellulären Membran-
lipiden verursachen, während eine solche Wirkung bei dem
kanzerogenen Nifurprazin nicht nachweisbar ist. Möglicher-
weise werden die reaktiven Nifurprazinmetaboliten so-
fort kovalent an zelluläre Makromoleküle gebunden und
entfalten so ihre kanzerogene Wirkung.

STUDY ON THE RADICAL FORMATION IN VIVO BY NITROFURANTOIN AND NIFURPRAZINE

Summary

In the present study the in vivo radical formation
by nitrofurantoin (Furadantin^R) and nifurprazine
(Carofur^R) was investigated.

The test animals were male white mice weighing about
35 g, which were bred by the Institute of Pharmacology,
Toxicology and Pharmacy.

The experiments were carried out without prior withdrawal
of food. The way of administration of the nitrofuran
derivatives was by intraperitoneal injection. The expira-
tion of ethane and ethylene, the formation of malonic
dialdehyde in the liver and the decrease of glutathione
concentration in liver were measured as indicators of
radical formation.

The results may be summarized as follows:

a) Nitrofurantoin increases the expiration of ethane
and decreases the glutathione concentration of liver.
Nifurprazine has no such effect, but it slightly
increases the formation of malonic dialdehyde. Both
nitrofurans do not influence the expiration of ethylene.

b) The expiration of ethane after administration of nitrofurantoin is increased by previous application of Fe^{2+} . If nitrofurantoin was substituted by nifurprazine this effect could not be observed.

c) A very impressive increase of the expiration of ethane after the application of nitrofurantoin is caused by the previous administration of diethylmaleinate (decrease of glutathione concentration) or diethylmaleinate combined with aminotriazole (increase of H_2O_2 concentration). After application of nifurprazine these effects are expressed only to a minor degree but in this case the expiration of ethylene is enhanced.

d) The induction or inhibition of

- mixed-function oxidases (by phenobarbital respectively piperonylbutoxide) and of
- the xanthine oxidase (by xanthine respectively allopurinol) shows no unequivocal effect.

From these results the conclusion is drawn that the non-cancerogenic nitrofurantoin causes the formation of radicals and other products of radical reactions, which initiate the damage of cellular and/or subcellular membranes. This effect could not be shown by the cancerogenic nifurprazine. Perhaps the reactive nifurprazine metabolites are bound at once covalently to the cellular macromolecules and thus cause the development of cancer.

VI Literaturverzeichnis (siehe auch Nachtrag)

Akao M, Kuroda K, Miyaki K

Metabolic degradations of nitrofurans by rat liver homogenate
Biochem. Pharmacol. 20, 3091-3096, 1971

Ames BN, McCann J, Yamasaki E

Methods for detecting carcinogens and mutagens with the
salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test
Mutat. Res. 31, 347-364, 1975

Anonym

Information bei Verdacht auf Arzneimittelnebenwirkungen
Deutsches Tierärzteblatt 24, 271, 1976

Asnis RE

The reduction of furacin by cell-free extracts of furacin-
resistant and parent-susceptible strains of Escherichia coli
Arch. Biochem. Biophys. 66, 208-216, 1957

Barber AA, Bernheim F

Lipid peroxidation: its measurement, occurrence, and
significance in animal tissues
Advan. Gerontol. Res. 2, 255-403, 1967

Bartoli GM, Sies H

Reduced and oxidized glutathione efflux from liver
FEBS Lett. 86, 89-91, 1978

Beckett AH, Robinson AE

The reactions of nitrofurans with bacteria - II. Reduction
of a series of antibacterial nitrofurans by Aerobacter
aerogenes
J. Med. and Pharm. Chem. 1, 135-153, 1959a

Beckett AH, Robinson AE

The reaction of nitrofurans with bacteria - III. Reduction of a series of antibacterial nitrofurans (type B compounds) by *Aerobacter aerogenes*

J. Med. and Pharm. Chem. 1, 155-164, 1959b

Beuter W

Untersuchung von Mangan(II)-, Nickel(II)-, Zinn(II)- und Blei(II)-Ionen auf radikalbildende Eigenschaften in vivo

München: Med. vet. Diss. 1981

Beuter W

Persönliche Mitteilung

München, 1984

Biaglow JE, Nygaard OF, Greenstock CL

Electron transfer in Ehrlich ascites tumor cells in the presence of nitrofurans

Biochem. Pharmacol. 25, 393-398, 1976

Boveris A, Cadenas E, Chance B

Ultraweak chemiluminescence: a sensitive assay for oxidative radical reactions

Fed. Proc, 40 (Symposium), 195-198, 1981

Bryan GT

Occurrence, production, and uses of nitrofurans

In: Bryan GT (Ed)

Carcinogenesis, Vol 4:Nitrofurans

New York: Raven Press, 1978

Buddecke E

Grundriß der Biochemie

11. Auflage

Berlin, New York: Walter de Gruyter, 1980

Bus JS, Gibson JE

Lipid peroxidation and its role in toxicology

Rev. Biochem. Toxicol. 1, 125-149, 1979

Chamberlain RE

Chemotherapeutic properties of prominent nitrofurans

J. Antimicrob. Chemother. 2, 325-336, 1976

Chance B, Sies H, Boveris A

Hydroperoxide metabolism in mammalian organs

Physiol. Rev. 59, 527-605, 1979

Chan PC, Peller OG, Kesner L

Copper(II)-catalyzed lipid peroxidation in liposomes
and erythrocyte membranes

Lipids 17, 331-337, 1982

Chatfield DH

Disposition and metabolism of some nitrofurylthiazoles
possessing antiparasitic activity

Xenobiotica 6, 509-520, 1976

Chatterjee SN, Maiti M, Ghosh S

Interaction of furazolidone with DNA

Biochim. Biophys. Acta 402, 161-165, 1975

Christen HR

Grundlagen der allgemeinen und anorganischen Chemie
6. Auflage

Frankfurt/Berlin/München: Otto Salle Verlag

Arau/Frankfurt/Salzburg: Verlag Sauerländer, 1980

Clarke ED, Wardman P, Wilson I

Cis-trans isomerisation of the (5-nitro-2-furyl)
acrylamide, AF-2, initiated by ascorbate, glutathione,
Fe(II) and OH⁻

Biochem. Pharmacol. 33, 83-87, 1984a

Clarke ED, Wardman P, Wilson I

The mechanism of the free-radical-induced chain isomerisation of 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide

J. Chem. Soc. Perkin. Trans. II, 1155-1161, 1984b

Cohen SM

Toxicity and carcinogenicity of nitrofurans

In: Bryan GT (Ed)

Carcinogenesis, Vol 4: Nitrofurans

New York: Raven Press, 1978

Cohen SM, Alter A, Bryan GT

Distribution of radioactivity and metabolism of formic acid 2-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-¹⁴C-2-thiazolyl]hydrazide following oral administration to rats and mice

Cancer Res. 33, 2802-2809, 1973

Cohen SM, Ertürk E, Bryan GT

Production of leukemia and stomach neoplasms in Swiss. RF, BALB/c, and C3H female mice by feeding N- 4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl acetamide

Cancer Res. 30, 2320-2325, 1970

Dahle LK, Hill EG, Holman RT

The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters

Arch. Biochem. Biophys. 98, 253-261, 1962

Dann O, Möller EF

Bakteriostatisch wirkende Nitro-Verbindungen des Thiophens und Furans

Chem. Ber. 80, 23-36, 1947

Demopoulos HB

The basis of free radical pathology

Fed. Proc. 32, 1859-1861, 1973a

Demopoulos HB

Control of free radicals in biologic systems

Fed. Proc. 32, 1903-1908, 1973b

Dillard CJ, Dumelin EE, Tappel AL

Effect of dietary vitamin E on expiration of pentane and ethane by the rat

Lipids 12, 109-114, 1977

Dillard CJ, Tappel AL

Fluorescent products of lipid peroxidation of mitochondria and microsomes

Lipids 6, 715-721, 1971

Dillard CJ, Tappel AL

Fluorescent products from reaction of peroxidizing polyunsaturated fatty acids with phosphatidyl ethanolamine and phenylalanine

Lipids 8, 183-189, 1973

Dillard CJ, Tappel AL

Volatile hydrocarbon and carbonyl products of lipid peroxidation: a comparison of pentane, ethane, hexanal, and acetone as in vivo indices

Lipids 14, 989-995, 1979

Di Lucio NR

Antioxidants, lipid peroxidation and chemical-induced liver injury

Fed. Proc. 32, 1875-1881, 1973

Dodd MC, Stillman WB

The in vitro bacteriostatic action of some simple furan derivatives

J. Pharmacol. Exp. Ther. 82, 11-18, 1944

Dumelin EE, Dillard CJ, Tappel AL

Effect of vitamin E and ozone on pentane and ethane
expired by rats

Arch. Environ. Health 33, 129-134, 1978

Dumelin EE, Tappel AL

Hydrocarbon gases produced during in vitro peroxidation
of polyunsaturated fatty acids and decomposition of
preformed hydroperoxides

Lipids 12, 894-899, 1977

Ebetino FF, Carroll JJ, Gever G

Reduction of nitrofurans I. Aminofurans

J. Med. Pharm. Chem. 5, 513-524, 1962

Ellman GL

Tissue sulfhydryl groups

Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77, 1959

Ertürk E, Price JM, Morris JE, Cohen S, Leith RS,
von Esch AM, Croveti AJ

The production of carcinoma of the urinary bladder in rats
by feeding N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide

Cancer Res. 27, 1998-2002, 1967

Ertürk E, Morris JE, Cohen SM, Price JM, Bryan GT

Transplantable rat mammary tumors induced by 5-nitro-2-
furaldehyde semicarbazone and by formic acid 2-[4-(5-nitro-
2-furyl)-2-thiazolyl]hydrazide

Cancer Res. 30, 1409-1412, 1970

Farkas J

5-Nitrofurylacrylic acid, a new conserving agent in
vinification

Mitt. Höheren Bundeslehr-Versuchsanst. Wein- Obstbau
Kloster Neuburg 25, 279-284, 1975

in: Chem. Abstr. 84, 119900, 1976

Flamigni F, Guarnieri C, Toni R, Caldarera CM
 Effect of oxygen radicals on heart mitochondrial function
 in α -tocopherol deficient rabbits
 Internat. J. Vit. Nutr. Res. 52, 402-406, 1982

Fridovich I
 Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity
 In: Pryor WA (Ed)
 Free radicals in biology, Vol I
 New York: Academic Press, 1976

Friedrich A
 Untersuchung von Chrom(III)-, Cobalt(II)-, Cer(III)-
 und Quecksilber(I)-Ionen auf radikalbildende Eigen-
 schaften in vivo
 München: Med. vet. Diss. 1981

Fukuzawa K, Tokumura A, Ouchi S, Tsukatani H
 Antioxidant activities of tocopherols on Fe^{2+} -ascorbate-
 induced lipid peroxidation in lecithin liposomes
 Lipids 17, 511-513, 1982

Gardner HW
 Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino
 acids: a review
 J. Agric. Food Chem. 27, 220-229, 1979

Gavin JJ, Ebetino FF, Freedman R, Waterbury WE
 The aerobic degradation of 1-(5-nitrofurfurylideneamino)-
 2-imidazolidinone (NF-246) by *Escherichia coli*
 Arch. Biochem. Biophys. 113, 399-404, 1966

Gee DL, Tappel AL
 Production of volatile hydrocarbons by isolated hepato-
 cytes: an in vitro model for lipid peroxidation studies
 Toxicol. and Appl. Pharmacol. 60, 112-120, 1981

Gienger RS

Metabolische Radikalbildung von Halothan

München: Med. vet. Diss. 1982

Ginter E, Košinová A, Hudecová A, Madarič A

Synergism between vitamins C and E: effect on microsomal hydroxylation in guinea pig liver

Internat. J. Vit. Nutr. Res. 52, 55-59, 1982

Graham PS, Hellyer RO, Ryan AJ

The inhibition of drug metabolizing enzymes by some naturally occurring compounds

Biochem. Pharmacol. 19, 759-768, 1970

Green HLM, Rogers AM, Muriel WJ, Ward AC, McCalla DR

Use of simplified fluctuation test to detect and characterize mutagenesis by nitrofurans

Mutat. Res. 44, 139-143, 1977

Haber F, Weiss J

Über die Katalyse des Hydroperoxides

Die Naturwissenschaften 20, 948-950, 1932

Hafeman DG, Hoekstra WG

Lipid peroxidation in vivo during vitamin E and selenium deficiency in the rat as monitored by ethane evolution

J. Nutr. 107, 666-672, 1977

Hamilton-Miller JMT, Brumfitt W

The versatility of nitro compounds

J. Antimicrob. Chemother. 2, 5-7, 1976

Hayllar BL, O'Neal AH, Dotterer JA

Metastatic testicular tumor treated with a maintenance dose of nitrofurazone

J. Urol. 84, 565-568, 1960

Hein H, Herman R, Miklovich M, Schaefer H, Steinijans V
 Untersuchung über die Wirkung von Nitrofuryl-propenyliden-
 benzhydraziden gegenüber Trichomonaden, Bakterien, Hefen
 und Pilzen unter besonderer Berücksichtigung der Ergeb-
 nisse im Ames-Test und Host-mediated assay
 Arzneimittelforschung (Drug Res.) 33, 363-369, 1983

Herrett RJ, Williams CW, Heotis JP, Buzard JA
 Metabolism of 5-nitro-2-furaldehyde acetylhydrazone-C¹⁴
 (nihydrazone) in the chick
 J. Agric. Food Chem. 15, 433-438, 1967

Herschberger LA, Tappel AL
 Effect of vitamin E on pentane exhaled by rats treated
 with methyl ethyl ketone peroxide
 Lipids 17, 686-691, 1982

Hochstein P, Jain SK
 Association of lipid peroxidation and polymerization
 of membrane proteins with erythrocyte aging
 Fed. Proc. 40, 183-188, 1981

Högberg J, Övrenius S, O'Brien PJ
 Further studies on lipid-peroxide formation in isolated
 hepatocytes
 Eur. J. Biochem. 59, 449-455, 1975

Ibrahiem EH1, Nigam VN, Brailovsky CA, Madarnas P,
 Elhilali M
 Orthotopic implantation of primary N-[4-(5-nitro-2-furyl)-
 2-thiazolyl]formamide-induced bladder cancer in bladder
 submucosa: an animal model for bladder cancer study
 Cancer Res. 43, 617-622, 1983

Ichikawa M

Chemistry of nitrofurans

In: Bryan GT (Ed)

Carcinogenesis, Vol 4: Nitrofurans

New York: Raven Press, 1978

Inui N, Kaketomi M, Nishi Y

Mutagenic effects of AF-2, a food additive, on embryonic cells of the Syrian golden hamster on transplacental application

Mutat. Res. 41, 351-360, 1976

Jaeger RJ, Conolly RB, Murphy SD

Effect of 18-hr fast on glutathione depletion on 1,1-dichloroethylene-induced hepatotoxicity and lethality in rats

Exp. Mol. Pathol. 20, 187-198, 1974

Johnson EF

Multiple forms of cytochrome P-450: criteria and significance

Rev. Biochem. Toxicol. 1, 1-26, 1979

Joner PE, Dahle HK, Aune T, Dybing E

Mutagenicity of nitrovin - A nitrofur feed additive

Mutat. Res. 48, 313-318, 1977

Junghanss W

Die Lokaltherapie von Wundinfekten mit Carofur, einem neuen Nitrofuran

Med. Welt 17, 530-536, 1966

Kahn W

Radikalbildung von bromierten Methanderivaten in vivo

München: Med. vet. Diss. 1984

Kanner J, Kinsella JE

Initiation of lipid peroxidation by a peroxidase/hydrogen peroxide/halide system

Lipids 18, 204-210, 1983

Karlson P

Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler

11. Auflage

Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1980

Khan AU

Singlet molekular oxygen from superoxide anion and sensitized fluorescence of organic molecules

Science 168, 476-477, 1970

King MM, Lai EK, McCay PB

Singlet oxygen production associated with enzyme-catalyzed lipid peroxidation in liver microsomes

J. Biol. Chem. 250, 6496-6502, 1975

Klemencic JM, Wang CY

Mutagenicity of nitrofurans

In: Bryan GT (Ed)

Carcinogenesis, Vol 4: Nitrofurans

New York: Raven Press, 1978

Kosower NS, Kosower EM

The glutathione - glutathione disulfide system

In: Pryor WA (Ed)

Free radicals in biology, Vol II

New York: Academic Press, 1976

Kreuzer F

Untersuchung von Enfluran auf radikalbildende Eigenschaften in vivo

München: Med. vet. Diss. 1982

Kunert KJ, Tappel AL

The effect of vitamin C on in vivo lipid peroxidation in guinea pigs as measured by pentane and ethane production
Lipids 18, 271-274, 1983

Kuroda Y

Mutagenesis in cultured human diploid cells III. Induction of 8-azaguanine-resistant mutations by furylfuramide
Mutat. Res. 30, 229-238, 1975

Langner C

Beeinflussung der metabolischen Radikalbildung von Halothan

München: Med. vet. Diss. 1984

Lissner J, Hug O

Radiologie

Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1975

Loewe H

Nitrofurant-Derivate

In: Ehrhart G, Ruschig H (Hrsg)

Arzneimittel, Band 4: Chemotherapeutika

Weinheim: Verlag Chemie, 1972

Mason RP, Holtzman JL

The role of catalytic superoxide formation in the O_2 inhibition of nitroreductase

Biochem. Biophys. Commun. 67, 1267-1274, 1975a

Mason RP, Holtzman JL

The mechanism of microsomal and mitochondrial nitroreductase. Electron spin resonance evidence for nitroaromatic free radical intermediates

Biochemistry 14, 1626-1632, 1975b

McCalla DR

Chloroplasts of *Euglena gracilis* affected by furadantin

Science 137, 225-226, 1962

McCalla DR

Effects of some nitrofurans on DNA synthesis and prophage induction

Can. J. Biochem. 42, 1245-1247, 1964

McCalla DR

Nitrofurans

In: Hahn FE (Ed)

Antibiotics, Vol V, Part 1

Berlin/Heidelberg/New York: Springer-Verlag, 1979

McCalla DR, Kaiser C, Green MHL

Genetics of nitrofurazone resistance in *Escherichia coli*

J. Bacteriol. 133, 10-16, 1978

McCalla DR, Olive P, Tu Y, Fan ML

Nitrofurazone-reducing enzymes in *E. coli* and their role in drug activation in vivo

Can. J. Microbiol. 21, 1484-1491, 1975

McCalla DR, Reuvers A, Kaiser C

Mode of action of nitrofurazone

J. Bacteriol. 104, 1126-1134, 1970

McCalla DR, Reuvers A, Kaiser C

Breakage of bacterial DNA by nitrofurans derivatives
Cancer Res. 31, 2184-2188, 1971

McCalla DR, Voutsinos D

On the mutagenicity of nitrofurans
Mutat. Res. 26, 3-16, 1974

McCay PB

Physiological significance of lipid peroxidation
Fed. Proc. 40 (Symposium), 173, 1981

McCay PB, Gibson DD, Hornbrook KR

Glutathione-dependent inhibition of lipid peroxidation
by a soluble, heat labile factor not glutathione
peroxidase
Fed. Proc. 40 (Symposium), 199-205, 1981

McCord JM

Superoxide, superoxide dismutase and oxygen toxicity
Rev. Biochem. Toxicol. 1, 109-124, 1979

Mead JF

Free radical mechanisms of lipid damage and consequences
for cellular membranes
In: Pryor WA (Ed)
Free radicals in biology, Vol I
New York: Academic Press, 1976

Miyaji T

Acute and chronic toxicity of furylfuramide in rats and
mice
Tohoku J. exp. Med. 103, 331-369, 1971

Morris JE, Price JM, Lalich JJ, Stein RJ

The carcinogenic activity of some 5-nitrofurantoin derivatives in the rat

Cancer Res. 29, 2145-2156, 1969

Nelson WO, Bunge RG

The effect of therapeutic dosages of nitrofurantoin (furadantin) upon spermatogenesis in man

J. Urol. 77, 275-281, 1957

Niehaus WG, Samuelsson B

Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation

Europ. J. Biochem. 6, 126-130, 1968

Nohl H

Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Superoxid-Radikalen und die regulatorische Rolle des Enzyms Superoxiddismutase

Klin. Wochenschr. 59, 1081-1091, 1981

Nomura T

Carcinogenicity of the food additive furylfuramide in foetal and young mice

Nature 258, 610-611, 1975

Nomura T, Kondo S

The enhancement effect of phenobarbital on toxicity of furylfuramide in mouse embryo

Mutat. Res. 35, 167-172, 1976

Okada S

Cells

In: Altman KI, Gerber GB, Okada S (Eds)

Radiation biochemistry, Vol I

New York/London: Academic Press, 1970

Olivard J, Rose GM, Klein GM, Heotis JP
Metabolic and photochemical hydroxylation of 5-nitro-
2-furancarboxaldehyde derivatives
J. Med. Chem. 19, 729-731, 1976

Olivard J, Valenti S, Buzard JA
The metabolism of 5-nitro-2-furaldehyde acetylhydrazone
J. Med. Pharm. Chem. 5, 524-531, 1962

Olive PL, McCalla DR
Damage to mammalian cell DNA by nitrofurans
Cancer Res. 35, 781-784, 1975

Olive PL, McCalla DR
Cytotoxicity and DNA damage to mammalian cells by
nitrofurans
Chem.-Biol. Interact. 16, 223-233, 1977

Ong TM, Shahin MM
Mutagenic and recombinogenic activities of the food
additive furylfuramide in Eukaryotes
Science 184, 1086-1087, 1974

Otten H, Plempel M
Antibiotika und Chemotherapeutika in Einzeldarstellung
In: Otten H, Plempel M, Siegenthaler W (Hrsg)
Antibiotika-Fibel
4. Auflage
Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1975

Ottolenghi A
Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids
Arch. Biochem. Biophys. 79, 355-363, 1959

Palermo D, Gentile G

Studies on the presence of nitrofurazone residues
in poultry muscle, internal organs and poultry eggs
Arch. Vet. Ital. 26, 81-85, 1975

Paul HE, Austin FL, Paul MF, Ells VR

Metabolism of nitrofurans. Ultraviolet absorption
studies of urinary end-products after oral administration
J. Biol. Chem. 180, 345-363, 1949

Paul HE, Ells VR, Kopko F, Bender RC

Metabolic degradation of the nitrofurans
J. Med. Pharm. Chem. 2, 563-584, 1960

Petz M

Rückstände im Ei nach Behandlung von Legehennen mit
Chloramphenicol und Furazolidon
Archiv für Lebensmittelhygiene 35, 51-54, 1984

Plaa GL, Witschi H

Chemicals, drugs, and lipid peroxidation
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 16, 125-141, 1976

Politzer IR, Griffin GW, Laseter JL

Singlet oxygen and biological systems
Chem.-Biol. Interactions 3, 73-93, 1971

Price JM, Morris JE, Lalich JJ

Evaluation of the carcinogenic activity of 5-nitrofurans
derivatives in the rat
Fed. Proc. 25, 419, 1966

Pryor WA

Free radical reactions and their importance in biological systems

Fed. Proc. 32, 1862-1869, 1973

Pryor WA

The role of free radical reactions in biological systems

In: Pryor WA (Ed)

Free radicals in biology, Vol I

New York: Academic Press, 1976

Pryor WA, Lightsey JW

Mechanisms of nitrogen dioxide reactions: initiation of lipid peroxidation and the production of nitrous acid

Science 214, 435-437, 1981

Recknagel RO, Glende EA Jr, Hruszkewycz AM

Chemical mechanisms in carbon tetrachloride toxicity

In: Pryor WA (Ed)

Free radicals in biology, Vol III

New York: Academic Press, 1977

Reynolds ES, Moslen MT

Free radical damage in liver

In: Pryor WA (Ed)

Free radicals in biology, Vol IV

New York: Academic Press, 1980

Rosenkranz HS

Studies on the mutagenicity of nitrofurans in

Salmonella typhimurium

Biochem. Pharmacol. 26, 896-898, 1977

Rosenkranz HS, Speck TW

Activation of nitrofurantoin to mutagen by rat liver nitroreductase

Biochem. Pharmacol. 25, 1555-1556, 1976

Schenkman JB, Gibson GG

Status of the cytochrome P-450 cycle

Trends. Pharmacol. Sci. 2, 150-152, 1981

Schmid A

Radikalbildung organischer Schadstoffe

Der praktische Tierarzt 63, 801-807, 1982

Schmid A

Persönliche Mitteilung

München, 1984

Schmid A, Christoph M

Untersuchung zur Genese der parenteralen Eisenvergiftung

Der praktische Tierarzt, 589-595, 1980

Schmid A, Richter E

Beeinflussung der Kupferempfindlichkeit von Erythrozyten

durch Vitamin E und/oder Vitamin E-Mangelfütterung; ein

Beitrag zur biologischen Bedeutung des Vitamin E

DTW 83, 212-214, 1976

Seligman ML, Flamm ES, Goldstein BD, Poser RG, Demopoulos

HB, Ransohoff J

Spectrofluorescent detection of malonaldehyde as a

measure of lipid free radical damage in response to

ethanol potentiation of spinal cord trauma

Lipids 12, 945-950, 1977

Sevanian A, Hacker AD, Elsayed N

Influence of vitamin E and nitrogen dioxide on lipid

peroxidation in rat lung and liver microsomes

Lipids 17, 269-277, 1982

Sies H, Cadenas E

Biological basis of detoxication of oxygen free radicals

In: Caldwell J, Jakoby WB (Eds)

Biological basis of detoxication

New York, London: Academic Press, 1983

Siu GM, Draper HH

Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro

Lipids 17, 349-355, 1982

Slater TF

Free radical mechanisms in tissue injury

London: Pion, 1972

Smith GJ, Dunkley WL

Initiation of lipid peroxidation by a reduced metal ion

Arch. Biochem. Biophys. 98, 46-48, 1962

Stein RJ, Yost O, Petrolunas F, von Esch A

Carcinogenic activity of nitrofurans. A histologic evaluation

Fed. Proc. 25, 291, 1966

Stier A

Lipid structure and drug metabolizing enzymes

Biochem. Pharmacol. 25, 109-113, 1976

Sugiyama T, Goto K, Uenaka H

Acute cytogenetic effect of 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide (AF-2, a food preservative) on rat bone marrow cells in vivo

Mutat. Res. 31, 241-246, 1975

Swaminathan S, Lower GM

Biotransformations and excretion of nitrofurans

In: Bryan (Ed)

Carcinogenesis, Vol 4: Nitrofurans

New York: Raven Press, 1978

Tapernoux A, Magat A, Faure N

Search for residues in pigs given Bifuran in the food

Rev. Med. Vet. 27, 545-561, 1964

Tappel AL

Lipid peroxidation damage to cell components

Fed. Proc. 32, 1870-1874, 1973

Tappel AL, Dillard CJ

In vivo lipid peroxidation: measurement via exhaled

pentane and protection by vitamin E

Fed. Proc. 40, 174-178, 1981

Tatsumi K, Kitamura S, Koga N, Yoshimura H, Kato Y

Cis-trans isomerization of nitrofurans derivatives by
xanthine oxidase

Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 947-952, 1976a

Tatsumi K, Kitamura S, Yoshimura H

Reduction of nitrofurans derivatives by xanthine oxidase
and microsomes

Arch. Biochem. Biophys. 175, 131-137, 1976b

Tatsumi K, Ou T, Yamaguchi T, Yoshimura H

Metabolism of drugs LXXIX. The metabolic fate of nitro-
furans derivatives (2). Degradation by small intestinal
mucosa and absorption from gastrointestinal tract

Chem. Pharm. Bull. 21, 191-201, 1973

Taylor JD, Paul HE, Paul FM

Metabolism of nitrofurans III. Studies with xanthine oxidase in vitro

J. Biol. Chem. 191, 223-231, 1951

Tazima Y, Kada T, Murakami A

Mutagenicity of nitrofuran derivatives, including furylfuramide, a food preservative

Mutat. Res. 32, 55-80, 1975

Tempel K

Radiologie für Veterinärmediziner

Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1983

Thurman RG, Kauffman FC

Factors regulating drug metabolism in interact hepatocytes

Pharm. Rev. 31, 229-251, 1980

Tomomura A, Sasaki MS

Chromosome aberrations and DNA repair synthesis in cultured human cells exposed to nitrofurans

Jpn. J. Genet. 48, 291-294, 1973

Toole JF, Parrish ML

Nitrofurantoin polyneuropathy

Neurology 23, 554-559, 1973

Tu Y, McCalla DR

Effect of activated nitrofurans on DNA

Biochim. Biophys. Acta 402, 142-149, 1975

Tu Y, McCalla DR

Effect of nitrofurazone on bacterial RNA and ribosome synthesis and on the function of ribosomes

Chem.-Biol. Interactions 14, 81-91, 1976

Vig BK, Natajaran AT, Zimmermann FK

Study on cytological effects of carofur - a new mutagen
Mutat. Res. 67, 459-473, 1976

Wang CY, Behrens BC, Ichikawa M, Bryan GT

Nitroreduction of 5-nitrofur derivatives by rat liver
xanthine oxidase and reduced nicotinamide adenine
dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase
Biochem. Pharmacol. 23, 3395-3404, 1974

Wang CY, Hayashida S, Pamukcu AM, Bryan GT

Enhancing effect of allopurinol on the induction of bladder
cancer in rats by N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]
formamide
Cancer Res. 36, 1551-1555, 1976

Wang CY, Lee HL

Mutagenic activity of carcinogenic and noncarcinogenic
nitrofurans and of urine of rats fed these compounds
Chem.-Biol. Interactions 15, 69-75, 1976

Waterbury WE, Freedman R

Induction of phage formation by nitrofurans
Can. J. Microbiol. 10, 932-934, 1964

Wegner DHG, Rohwedder RW

The effect of nifurtimox in acute Chagas' infection
Arzneimittelforschung (Drug Res.) 22, 1624-1635, 1972

Wiegand H, Hoyer GA, Kieslich K

Mikrobiologische Spaltung eines Nitrofur-Derivates
Chem. Ber. 106, 1303-1308, 1973

Yahagi T, Matsushima T, Nagao M, Seino Y, Sugimura T,
Bryan GT

Mutagenicities of nitrofurantoin derivatives on a bacterial
tester strain with an R factor plasmid

Mutat. Res. 40, 9-14, 1976

Yahagi T, Nagao M, Hara K, Matsushima T, Sugimura T,
Bryan GT

Relationships between the carcinogenic and mutagenic or
DNA-modifying effects of nitrofurantoin derivatives, including
2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, a food
additive

Cancer Res. 34, 2266-2273, 1974

Nachtrag:

Abramson H

The oxidation of unsaturated fatty acid in normal
and scorbutic guinea pigs

J. Biol. Chem. 178, 179-183, 1949

Beauchamp C, Fridovich I

A mechanism for the production of ethylene from methional

J. Biol. Chem. 24, 4641-4646, 1970

Bernheim F, Bernheim MLC, Wilbur KM

The reaction between thiobarbituric acid and the
oxidation products of certain lipids

J. Biol. Chem. 174, 257-164, 1945

Bus JS, Gibson JE

Role of activated oxygen in chemical toxicity

In: Mitchell JR, Horning MG (Eds)

Drug metabolism and drug toxicity

New York: Raven Press, 1984

Cohen G, Riely C, Lieberman M
Ethane formation from lipid peroxides in mammalian cells
Fed. Proc. 27, abstract 2436, 648, 1968

Lieberman M, Kunishi AT
Ethylene production from methionine
Biochem. J. 97, 449-459, 1965

Mitchell JR, Smith CV, Lauterburg BH, Huges H,
Corcoran GB, Horning EC
Reactive metabolites and the pathophysiology of acute
lethal cell injury
In: Mitchell JR, Horning MG (Eds)
Drug metabolism and drug toxicity
New York: Raven Press, 1984

Riely CA, Cohen G, Lieberman M
Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation
Science 183, 208-210, 1974

Saran M, Bors W, Michel C, Elstner EF
Formation of ethylene from methionine Reactivity of
radiolytically produced oxygen radicals and effect of
substrate activation
Int. J. Radiat. Biol. 37, 521-527, 1980

Schmid A, Beuter W, Friedrich A
Lipidperoxidation in vivo durch Schwermetalle
Wien. tierarztl. Mschr. 70, 77-81, 1983

Sosnowsky G, Rawlinson DJ
In: Swern D (Ed)
Organic peroxides Vol II
New York: J. Wiley & Sons, 1971

Szybalski W

Special microbiological systems II. Observations
on chemical mutagenesis in microorganisms

Ann. N. Y. Acad. Sci. 76, 475-489, 1958

Mein sehr herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Schmid für die Überlassung des Themas, sowie für seine wissenschaftliche Anleitung und seine stets freundlich gewährte Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Außerdem danke ich Frau B. Ferlings und Herrn Dr. W. Beuter, die mir oftmals wertvolle Hilfe leisteten.

LEBENS LAUF

Geburtstag: 25. 4. 1957

Geburtsort: Kösching, Kreis Eichstätt

Eltern: Adelinde Loserth, geb. Jakusch
Josef Loserth, verst. am 9. 5. 1978

Schulbildung: Besuch der Volksschule in Kösching
1968 Eintritt in das Christoph-Scheiner-
Gymnasium Ingolstadt
Abitur 1977

Wehrdienst: Juli 1977 bis September 1978 in
Ingolstadt

Studium: ab Wintersemester 1978/79 Studium der
Veterinärmedizin an der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians Uni-
versität München

Staatsexamen: 1983 in München

Approbation: 1983 in München

Familienstand: seit 1983 verheiratet mit
Carola Loserth, geb. Geyer

